

DNA-Protein-Komplexe
in
Adenovirus-infizierten
Zellen

Johannes Fütterer

1982

DNA-Protein-Komplexe
in
Adenovirus-infizierten
Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians Universität München

vorgelegt von
Johannes Fütterer
München 1982

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 4. 1982



Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 1978 bis Oktober 1981 am Institut für Biochemie der Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker danke ich für die Unterstützung, die er dieser Arbeit zuteil werden ließ.

Frau Prof. Dr. E. Fanning danke ich für die Überlassung von biologischem Material und die Einführung in verschiedene Arbeitstechniken.

Frau Dr. R. Scheid danke ich für die Hilfe bei den Immunisierungen.

Frau B. Dietl und Frau I. Pfitzinger danke ich für die wertvolle Hilfe bei der Isolierung von DNA-Protein-Komplexen.

Herrn Dr. H. Ibelgaufts danke ich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Frau S. Nieberl und Frau K. Ullrich danke ich für die Mithilfe bei der Fertigstellung des vorliegenden Manuskripts.

Ferner möchte ich allen übrigen Mitarbeitern des Arbeitskreises für ihre ständige Hilfsbereitschaft danken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeine Einführung	1
1.2 Struktur der Adenoviren	3
1.2.1 Struktur des Kapsids	3
1.2.2 Core-Proteine	4
1.2.3 Struktur der viralen DNA	4
1.3 Der lytische Infektionszyklus	5
1.3.1 Die frühe Phase	6
1.3.2 Die späte Phase	8
1.3.2.1 Späte Transkription und Translation	9
1.4 DNA-Replikation	11
1.4.1 Wichtige Proteine für die Adenovirus-DNA-Replikation	11
1.4.2 Struktur und Eigenschaften replizierender DNA-Moleküle	11
1.4.3 Modell der Adenovirus-DNA-Replikation	13
1.4.4 Initiation der DNA-Replikation	14
1.5 Virusbildung	17
1.6 Das terminale Protein	21
1.7 Aufgabenstellung	25
2. Material	26
2.1 Abkürzungen	26
2.2 Zellen	27
2.3 Virusmaterial	27
2.4 Bakterien	28
2.5 Seren und Medien	28
2.6 Chemikalien und andere Materialien	28
2.7 Lösungen und Medien	31

3. Methoden	33
3.1 Zellkulturen	33
3.2 Virusvermehrung von Adenovirus Typ 2	33
3.2.1 Virusvermehrung in HeLa-Suspensionskulturen	33
3.2.2 Virusvermehrung in HeLa-Einschichtkulturen	34
3.2.3 Virusvermehrung in BHK-, TC 7- und Mm-Zellen	36
3.3 Extraktion viraler DNA aus Viruspartikeln	37
3.3.1 Extraktion von proteinfreier DNA	37
3.3.2 Extraktion und Reinigung eines DNA-Protein-Komplexes, der nur das terminale Protein enthält	37
3.4 Markierung viraler DNA in Ad2-infizierten Zellen	38
3.5 Reinigung der Restriktionsendonuklease HpaI aus <u>Haemophilus parainfluenza</u>	40
3.6 Fragmentierung von Adenovirus-DNA mit Restriktionsendonukleasen	42
3.7 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten auf Agarose-Gelen	43
3.8 Gelelektrophorese von Adenovirus-DNA-Restriktionsfragmenten auf Agarose-Polyacrylamid-Mischgelen	44
3.9 BND-Cellulose-Chromatographie von Adenovirus-DNA	45
3.10 Adenovirus-DNA-Replikation IN VITRO	46
3.10.1 Isolierung von Zellkernen aus Ad2-infizierten Zellen	46
3.10.2 Präparation von Kernextrakten	47
3.10.3 DNA-Replikation IN VITRO	48
3.11 Gelelektrophorese von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen	48
3.11.1 Gele und Proben	48
3.11.2 Proteinnachweis im Gel	49

3.12	Markierung des terminalen Proteins mit ^{125}J -Bolton-Hunter-Reagens	50
3.12.1	Proteinmarkierung	50
3.12.2	Abtrennung von nicht proteingebundenem ^{125}J	51
3.13	Partielle Proteolyse mit V8-Protease aus <u>Staphylococcus aureus</u>	52
3.14	Isolierung und Charakterisierung junger Viren	52
3.14.1	Isolierung junger Virionen	52
3.14.2	Charakterisierung junger Virionen	53
3.14.2.1	Dichtebestimmung junger Virionen	53
3.14.2.2	Bestimmung der DNase-Sensitivität junger Virionen	54
3.14.2.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	54
3.15	Gewinnung eines Antiserums gegen das terminale Protein	54
3.15.1	Immunisierung	54
3.15.2	Gewinnung von Antiseren	55
3.16	Isolierung und Fixierung von <u>Staphylococcus aureus</u> , Cowan I	55
3.17	Immunpräzipitationen	
4.	Ergebnisse	59
4.1	Verhalten von proteinhaltigen Adenovirus-DNA-Fragmenten auf Agarose-Acrylamid-Mischgelen	59
4.2	Gelelektrophoretische Untersuchungen von Adenovirus-DNA aus infizierten Zellen	63
4.2.1	Untersuchung intrazellulärer viraler DNA aus Pulsmarkierungsexperimenten	64
4.2.2	Untersuchung von intrazellulärer viraler DNA aus Puls-Chase-Experimenten	67
4.2.3	Untersuchung von IN VITRO-replizierter viraler DNA	70

4.3	Vergleich der terminalen Proteine an replizierender und reifer viraler DNA	72
4.4	Das terminale Protein ist viruskodiert	75
4.4.1	Isolierung von Ad2-DNA-Protein-Komplexen aus infizierten HeLa-, BHK-, Mm- und TC7-Zellen	76
4.4.2	Charakterisierung der DNA-Protein-Komplexe	77
4.4.3	Vergleich der terminalen Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	81
4.4.4	Vergleich der terminalen Proteine durch partielle Proteolyse mit V8-Protease	83
4.5	Zeitliche Bestimmung des Übergangs vom 82K- zum 55K-Protein	85
4.5.1	Isolierung von DNA-Protein-Komplexen aus jungen Virionen	85
4.5.2	Isolierung und Charakterisierung junger Virionen (Edvardsson et al., 1976)	88
4.5.2.1	Isolierung junger Virionen	90
4.5.2.2	Dichtebestimmung von jungen Virionen	92
4.5.2.3	Charakterisierung der DNA aus jungen Virionen aus der Kernfraktion	94
4.5.2.4	Das Proteinnmuster der Virusreifungsintermediate	99
4.5.2.5	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Virusreifungsintermediate	99
4.6	Gewinnung eines Antiserums gegen das terminale Protein	103
5.	Diskussion	107
5.1	Die Rolle des terminalen Proteins bei der Adenovirus-DNA-Replikation	107
5.2	Das terminale Protein ist viruskodiert	114
5.3	Das terminale Protein während der Virusmorphogenese	117
6.	Zusammenfassung	123
7.	Literaturverzeichnis	125

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Die große Komplexität von Säugetierzellen macht molekularbiologische Untersuchungen an ihnen äußerst schwierig. Vor allem komplizierte Kontrollmechanismen, wie sie für die DNA-Transkription und -Replikation bestimmend sind, lassen sich am Modell kleiner, besser definierter Genome leichter aufklären. Die tierischen und menschlichen Viren besitzen solche relativ kleinen Genome, und so hat das System der virusinfizierten Zelle in den letzten Jahren viele wertvolle Aufschlüsse über zelluläre Kontrollmechanismen gegeben. Ein besonders gut untersuchter Fall sind die Wechselwirkungen zwischen Adenoviren und tierischen oder menschlichen Zellen. Das Adenovirusgenom hat die Kapazität für etwa 30-40 Proteine zu kodieren. Für viele wichtige Schritte der Virusvermehrung werden aber auch zelluläre Enzyme verwendet, so daß gerade in diesen Fällen Schlüsse auf zelluläre Mechanismen gezogen werden können. Ein weiterer Vorteil des Adenovirussystems ist die außerordentliche Effizienz der Infektion, die zur Synthese von bis zu 5×10^5 Viruspartikeln pro infizierter Zelle führen kann, wobei die zelluläre DNA-, mRNA- und Protein-Synthese spät nach der Infektion völlig unterdrückt wird. Dadurch werden große Mengen untersuchbaren Materials zugänglich.

Vertreter der Adenoviren wurden erstmals 1953 und 1954 beschrieben (Rowe et al., 1953, Hilleman und Werner, 1954). Seitdem wurden über 80 Serotypen aus Respirationstrakten verschiedener Tierarten isoliert (Übersichtsartikel: Philipson et al., 1975, Wold et al., 1978). Die menschlichen Adenoviren, von denen bisher mindestens 33 Serotypen bekannt sind, wurden bezüglich ihrer chemischen und biologischen Eigenschaften zunächst in drei Gruppen eingeteilt (Green und Piña, 1964, Piña und Green, 1965, Hübner, 1967). Später wurde diese Ein-

Polypeptide SDS-gel Structural Unit

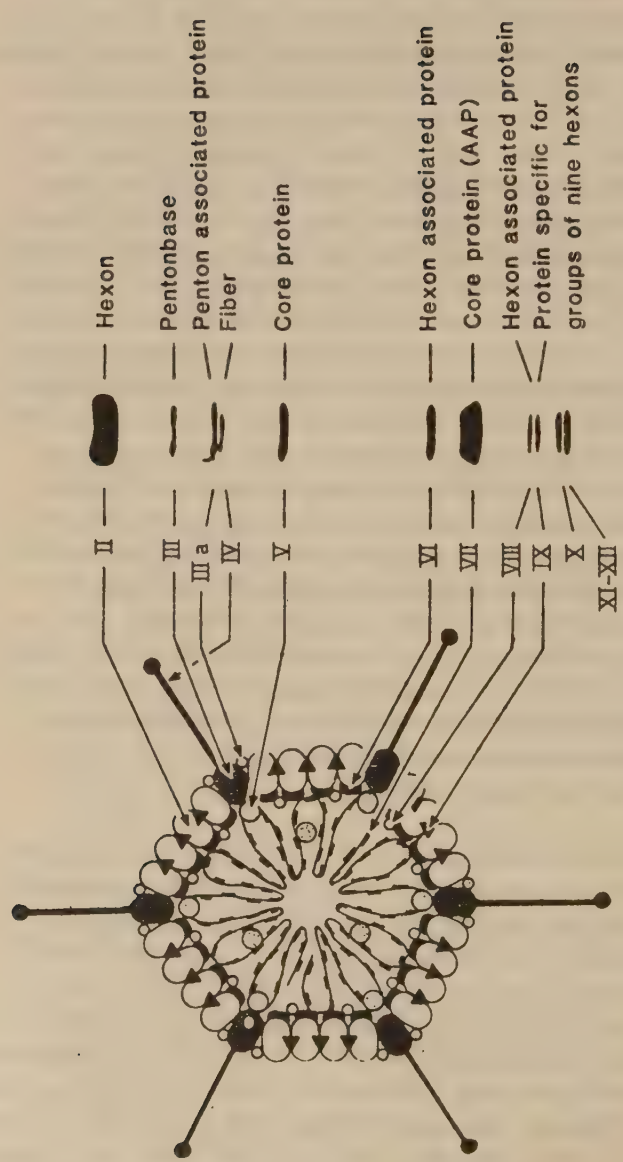


Abb. 1: Strukturmodell des Adenovirus Typ 2 Virions und Muster der viralen Strukturproteine in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Persson und Philipson, 1982). Das Modell ist im Text beschrieben.

teilung aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, das heißt nach dem Verwandtschaftsgrad der viralen DNA, auf fünf Gruppen erweitert (Green et al., 1979a):

Gruppe	Vertreter	DNA-Homologie (%)		DNA (% G+C)	Onkogenität
		in der Gruppe	zu Vertretern anderer Gruppen		
A	12,18,31	48-69	8-20	47-49	hoch
B	3,7,11, 14,16,21	89-94	9-20	49-52	mittel
C	1,2,5,6	99-100	10-16	57-59	niedrig
D	8,9,10, 13,15,17, 19,20, 22-30	94-99	4-17	57-59	niedrig
E	4		4-23		niedrig

Tabelle 1: Einteilung der menschlichen Adenoviren nach Green et al., 1979a.

1.2 Struktur der Adenoviren

Alle Adenovirionen haben dieselbe Struktur (Abb.1).

1.2.1 Struktur des Kapsids

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen sich die Adenovirionen als ikosaedrische Partikel mit einem Durchmesser von 65 - 80 nm. Die 20 Dreiecksflächen werden von insgesamt 240 Hexonkapsomeren gebildet, die Ecken von 12 Pentonkapsomeren. Von den Ecken ragen die Fiberproteine nach außen. Ihre Länge variiert in den einzelnen Untergruppen.

Das Hexon trägt das gruppenspezifische Antigen, das allen Adenoviren (mit Ausnahme der Vogelviren) gemeinsam ist (Wilcox et al., 1963, Valentine und Periera, 1965, Norrby, 1968).

1.2.2 Core-Proteine

Die Virus-DNA ist mit den Proteinen V und VII (MW 45000 und 17000 d) assoziiert und enthält außerdem an ihrem Ende je ein kovalent gebundenes Protein mit einem Molekulargewicht von 55000 d. Im sogenannten DNA-Protein-Core scheint das Protein VII direkt entlang der gesamten doppelsträngigen DNA gebunden zu sein, während Protein V in geringerer Kopienzahl mit dem DNA-Protein VII-Komplex assoziiert ist. Protein V läßt sich durch Behandlung mit 0,5 % Sarkosyl vom "Rest-core" abtrennen, während Protein VII erst durch Guanidiniumhydrochlorid (4M) von der DNA getrennt werden kann (Robinson und Bellet, 1974, Brown et al., 1975). Beide Proteine sind argininreich. Protein VII ähnelt in seiner Aminosäureverteilung dem Histon H4 (Lischue und Sung, 1977).

Außer den erwähnten Proteinen lassen sich noch eine Reihe anderer Polypeptide im Viruspartikel nachweisen. Die Gesamtzahl der Strukturproteine ist nicht genau bekannt. Je nach Methode können 10 - 14 nachgewiesen werden (Maizel et al., 1968, Everitt et al., 1973). Im Gegensatz zu Papovaviren, die für ihren Aufbau Histone der Wirtszelle verwenden, scheinen alle Adenovirusstrukturproteine viruskodiert zu sein.

1.2.3 Struktur der viralen DNA

Die Adenoviren besitzen ein Genom aus doppelsträngiger DNA mit einem Molekulargewicht von $20-25 \times 10^6$ Dal-

ton (Green et al., 1967a). Sie können damit für 30 bis 40 Proteine durchschnittlicher Größe kodieren. Wenn die DNA unter Verwendung proteolytischer Enzyme isoliert wird, erscheint sie linear. Andernfalls kann zumindest ein Teil der DNA in zirkulärer Form nachgewiesen werden. Die Zirkularisierung erfolgt über das kovalent gebundene terminale Protein (Robinson und Bellet, 1974).

Ein auffälliges Charakteristikum der Adenovirus-DNA ist eine umgekehrte terminale Repetition (Bellet und Younghusband, 1972, Garon et al., 1972, Wolfson und Dressler, 1972). Das bedeutet, daß die Doppelstrangenden identisch und die Einzelstrangenden zueinander komplementär sind, so daß sie sogenannte "panhandle"-Strukturen ausbilden können. Die Länge dieser Repetition wurde bei Adenovirus Typ2 auf 102 und bei Typ5 auf 103 Basenpaare bestimmt (Roberts et al., 1974, Arrand und Roberts, 1979, Steenbergh et al., 1977, Wu et al., 1977).

Nach einem Vorschlag von Sharp (1977) wird das Genom so dargestellt, daß das AT-reichere Ende nach rechts und der nach rechts transkribierte DNA-Strang (der r-Strang) nach oben zu liegen kommt.

1.3 Der lytische Infektionszyklus

Der produktive Infektionszyklus wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt (s. Abb.2). Die zwei Phasen sind durch den Beginn der viralen DNA-Replikation getrennt. (Übersichtsartikel: Persson und Philipson, 1982).

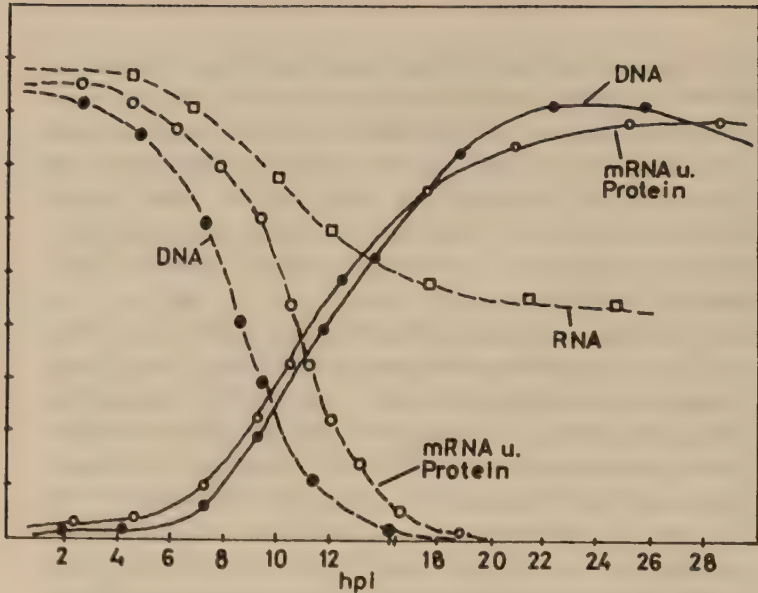


Abb.2: Synthese von zellulären (---) und viralen (—) Makromolekülen während des lytischen Infektionszyklus.

1.3.1 Die frühe Phase

Untersuchungen der ersten Schritte des Infektionszyklus - Adsorption, Penetration und "uncoating" - werden durch das ungünstige Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln (pfu) zur Gesamtzahl der Virionen erschwert (1 : 11 bis 1 : 2300) (Green et al., 1967b, Lonberg-Holm und Philipson, 1969).

Adenoviren adsorbieren über das Fiberprotein an spezifische Rezeptoren der Zellmembran (Levine und Ginsberg, 1967, Svensson et al., 1981) und dringen als Ganzes durch Pinozytose oder ähnliche Vorgänge in die Zellinnere (Lonberg-Holm und Philipson, 1969, Morgan et al., 1969, Chardonnet und Dales, 1970a und b).

Nach Abspaltung des Pentons wird das Restkapsid durchs Zytoplasma zu den Poren der Kernmembran transportiert. Dort werden die übrigen Kapsidproteine entfernt und das DNA-Proteincore in den Kern eingeschleust (Sussenbach, 1967, Dales und Chardonnet, 1973, Luftig und Weihing, 1975, Miles et al., 1980). Dieser Vorgang dauert etwa zwei Stunden (Philipson et al., 1968) und wird durch unbekannte zelluläre oder viruseigene Enzyme vermittelt. Im Kern beginnt die Synthese virusspezifischer RNA.

Die frühe Phase ist gekennzeichnet durch die Aktivierung - zum Teil kaskadenartig - von mindestens sechs Transkriptionspromotoren auf der viralen DNA (Hashimoto und Green, 1979, Persson et al., 1981). Über einen Bereich von 1 - 100 pfu/Zelle ist die Menge früher mRNAs unabhängig von der Multiplizität der Infektion (Flint und Sharp, 1976, Berk und Sharp, 1977). Der Anteil der einzelnen mRNAs an der Gesamtmenge ist unterschiedlich und ändert sich im Verlauf der Infektion (Spektor et al., 1978). Die frühe virale RNA repräsentiert nur 0,1 % der gesamten zytoplasmatischen RNA (Lindberg et al., 1972). Sie wird in mindestens zehn Polypeptide translatiert (Persson et al., 1979a). Durch IN VITRO-Translation konnten diese Proteine bestimmten Regionen auf der DNA zugeordnet werden (Lewis et al., 1976) (s. Abb.3). IN VITRO-Translation früher mRNA lieferte auch eine Reihe anderer, IN VIVO bisher nicht beobachteter Proteinfamilien.

Nur einem dieser Proteine, dem 72K-Protein, läßt sich eine biologische Funktion zuordnen. Es bindet an einzelsträngige DNA (van der Vliet und Levine, 1973, Levine et al., 1974, van der Vliet et al., 1975) und wird bei der DNA-Replikation für Initiation und Elongation benötigt (van der Vliet und Sussenbach, 1975, Flint et al., 1976, van der Vliet et al., 1977). Auch

für die IN VITRO-Elongationsreaktion scheint es essentiell (Brison et al., 1977, Keding et al., 1978, Kaplan et al., 1979, Ariga et al., 1980). Aus Untersuchungen an temperatursensitiven Mutanten ist bekannt, daß es mindestens noch zwei weitere frühe Proteine geben muß, die direkt für die virale DNA-Synthese nötig sind (s. Tabelle 2).

Mutante	thermolabiles Protein bzw. Genort	Literatur
H2 ts201	72K-Protein	Kathmann et al., 1976 Winnacker, 1978
H5 ts125	"	Ensinger und Ginsberg, 1972 van der Vliet und Sussenbach, 1975, Sussenbach und Kuijk, 1978
H5 ts36	18,5 - 22	Wilkie et al., 1973
H5 ts69	"	Ginsberg et al., 1974
H5 ts149	"	Williams et al., 1974 Galos et al., 1979
H2 ts206	29 - 31,5	Kathmann et al., 1976 Ullrich, 1979
H2 ts214	nicht bekannt	Kathmann et al., 1976 Reiter, 1980
H2 ts111	nicht bekannt	Martin et al., 1978

Tabelle 2: Frühe DNA-negative Adenovirus ts-Mutanten.

1.3.2 Die späte Phase

Sechs bis acht Stunden nach der Infektion beginnt die DNA-Replikation und damit auch die späte Transkription. Gleichzeitig wird die Synthese zellulärer

DNA und zellulärer Proteine langsam unterdrückt (Ginsberg et al., 1967, Piña und Green, 1969, Russell und Skehel, 1972). Zelluläre RNA wird während des ganzen Infektionszyklus synthetisiert, aber nur ein Teil der Vorläufer für ribosomale RNA wird ins Zytoplasma transportiert (Ledinko, 1970, Raskas et al., 1970, Beltz und Flint, 1979). Die zellulären Enzyme für den DNA-Metabolismus bleiben unverändert aktiv (Green et al., 1964, Ledinko, 1968, Piña und Green, 1969), sind aber offenbar einer viralen Kontrolle unterworfen. 10 - 13 Stunden nach der Infektion werden fast nur noch virale DNA und Proteine neu synthetisiert (s. Abb.2).

1.3.2.1 Späte Transkription und Translation

16 - 20 Stunden nach der Infektion sind 20 - 40 % der Gesamt-RNA und nahezu alle mRNAs im Zytoplasma viralen Ursprungs (Rose et al., 1965, Thomas und Green, 1966, Lucas und Ginsberg, 1971, Lindberg et al., 1972, Tal et al., 1975). Die mRNA wird zu 80 % vom viralen r- und zu 20 % vom viralen l-Strang abgelesen (Green et al., 1970, Tibbetts et al., 1974, Sharp et al., 1975, Ortin et al., 1976, Smiley und Mak, 1976). Dabei sind auch frühe Sequenzen vertreten. Die späten mRNAs, die komplementär zum r-Strang sind, werden durch splicing aus einem einzigen 28000 Basen langen Vorläufer erzeugt (Bachenheimer und Darnell, 1975, Klessig, 1977, Ziff und Evans, 1978). Auch die l-Strang-spezifische mRNA wird aus größeren Vorläufern herausgeschnitten (Chow et al., 1977, Chow und Broker, 1978) (s. Abb.3). Die späten mRNAs werden überwiegend in virale Strukturproteine übersetzt.

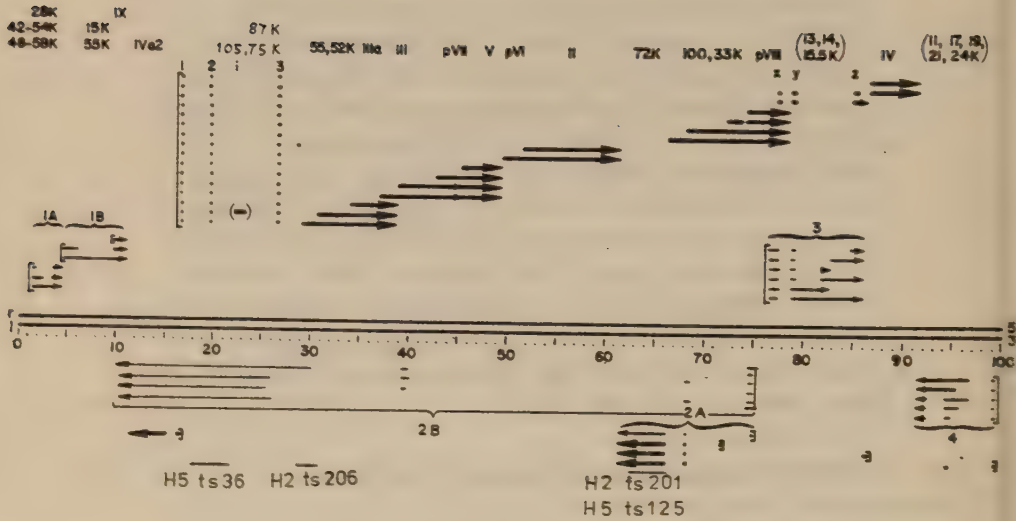


Abb.3: Die zytoplasmatischen RNAs von Adenovirus Typ2. Pfeile geben die jeweiligen Transkriptionsrichtung an. Dünne Pfeile stehen für frühe Transkription, dicke Pfeile für späte. Die Position der Promotoren ist durch senkrechte Klammern bezeichnet. Die zugeordneten Proteine sind durch römische Zahlen (=virale Strukturproteine) oder durch ihr Molekulargewicht (K=1000) bezeichnet. Außerdem ist die Position der thermolabilen Produkte der temperatursensitiven Mutanten aus Tabelle 2 angegeben.

1.4 DNA-Replikation

(Übersichtsartikel: Winnacker, 1978)

1.4.1 Wichtige Proteine für die Adenovirus-DNA-Replikation

Der Mechanismus der DNA-Replikation der Adenoviren ist, was die daran beteiligten Proteine angeht, noch weitgehend unbekannt. Die viralen Proteine unter ihnen sind ausnahmslos während der frühen Phase erstellt worden. Aus dieser Gruppe ist wiederum nur das DNA-bindende 72K-Protein genauer untersucht (s. 1.3.1). Ein großer Teil der Synthesearbeit scheint von zellulären Enzymen verrichtet zu werden. Einige konnten so auch in Replikations- und Transkriptionskomplexen aus adenovirusinfizierten Zellen nachgewiesen werden, zum Beispiel RNA-Polymerase II, eine DNA-Ligase und die DNA-Polymerasen α und γ (Wilhelm et al., 1976, Arens et al., 1977, Brison et al., 1977, Kaplan et al., 1977, Yamashita et al., 1977).

1.4.2 Struktur und Eigenschaften replizierender DNA-Moleküle

Aus infizierten Zellen läßt sich neben intakter, einheitslanger DNA auch replizierende DNA isolieren, die sich in drei Punkten von fertiggestellter unterscheidet:

- a) Sie weist eine um 6-8 mg/ml erhöhte Schwebedichte im neutralen CsCl-Gradienten auf (van der Eb, 1973, Pettersson, 1973, Sussenbach et al., 1973). Diese erhöhte Schwebedichte ist sensitiv gegenüber Behandlung mit der einzelstrangspezifischen Nuklease aus *Neurospora crassa* (Pettersson, 1973, Bourgeaux et al., 1976).

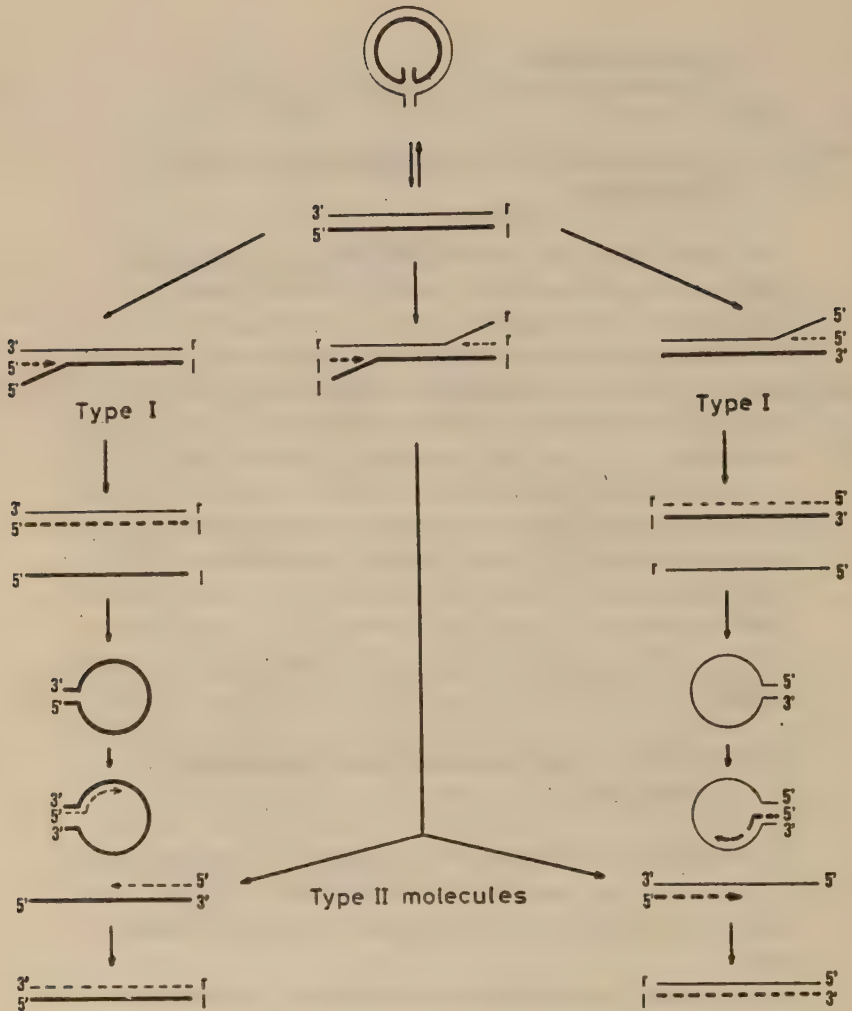


Abb. 4: Modell der Adenovirus-DNA-Replikation (nach Lechner und Kelly, 1977). Das Modell ist im Text beschrieben.

b) Im neutralen Rohrzuckergradienten sedimentieren diese Moleküle schneller als fertig synthetisierte DNA (35 - 60 S gegenüber 30,5 S) (Horwitz, 1971, van der Eb, 1973, Sussenbach et al., 1973).

c) Replizierende Moleküle haben einen partiell einzelsträngigen Charakter (Ellens et al., 1974, Lechner und Kelly, 1977).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, daß es im wesentlichen zwei Sorten von replizierenden Molekülen gibt: Erstens lineare, doppelsträngige Moleküle mit einer oder (seltener) mehreren einzelsträngigen Verzweigungen (Typ I-Moleküle) und zweitens lineare Moleküle, die partiell einzelsträngig sind (Typ II-Moleküle) (Lechner und Kelly, 1977, Revet und Benichou, 1981). Alle diese Moleküle haben Genomlänge. Wie partielle Denaturierungsmuster zeigen sind im Doppelstranganteil der Typ II-Moleküle beide Genomenden mit gleicher Häufigkeit vertreten (Lechner und Kelly, 1977).

1.4.3 Modell der Adenovirus-DNA-Replikation (s. Abb. 4)

Die DNA-Replikation erfolgt semikonservativ. Die Initiation findet an einem der beiden Enden des viralen Genoms statt und zwar an beiden Enden mit der gleichen Wahrscheinlichkeit. Der Tochterstrang wächst in 5'-3'-Richtung und verdrängt dabei schrittweise den nicht als Matrix benötigten Elternstrang. Dabei entstehen Typ I-Moleküle. Der verdrängte Elternstrang kann über die invertierte terminale Repetition sogenannte "panhandles" bilden. Der dabei entstehende basengepaarte Bereich ist mit den Enden des doppelsträngigen viralen Genoms identisch. Es erfolgt eine erneute Initiation und Synthese eines Tochterstrangs, wobei nun Typ II-Moleküle entstehen (Lechner und Kelly, 1977).

Die in diesem Modell geforderten "panhandle"-förmigen Zwischenstufen konnten IN VIVO bisher allerdings nicht beobachtet werden. Sie ermöglichen jedoch prinzipiell, daß alle in einer Replikationsrunde auftretenden Initiationsvorgänge an strukturell identischen Molekülen stattfinden können. Sie lieferten gleichzeitig eine Erklärung für den Nutzen eines so auffälligen Strukturmerkmals wie der invertierten terminalen Repetition

Das geschilderte Modell steht im Einklang mit Versuchsergebnissen über die Initiations- und Terminationspunkte der DNA-Replikation: Es konnte gezeigt werden, daß die Termination an beiden molekularen Enden des viralen Genoms erfolgen kann, wobei der Tochterstrang jeweils zum 3'-Ende hin synthetisiert wurde (Schilling et al., 1975, Tolun und Pettersson, 1975, Harwitz, 1976, Weingärtner et al., 1976, Sussenbach und Kuijk, 1977, Ariga und Shimojo, 1978). Neuere Untersuchungen ergaben, daß auch die Initiation an oder nahe den Enden der DNA stattfindet (Sussenbach und Kuijk, 1978a, Ariga und Shimojo, 1978, Reiter et al., 1980).

1.4.4 Initiation der DNA-Replikation

Der Mechanismus der Initiation der DNA-Replikation ist noch weitgehend ungeklärt. Alle bisher bekannten eukaryontischen DNA-Polymerasen benötigen eine freie 3'-OH-Gruppe als "Primer" für die DNA-Synthese (Weissbach, 1975 und 1977). Bei linearen DNA-Molekülen mit terminaler Redundanz kann dieser Primer über ringförmige oder konkatemere replikative Zwischenstufen vom replizierenden DNA-Molekül selbst zur Verfügung gestellt werden. Beispiele dafür sind die frühe replikative Zwischenstufe des Phagen λ (Tomizawa

und Ogawa, 1968) oder Zwischenstufen bei der T7-DNA-Replikation (Kelly und Thomas, 1969). Bei Adenoviren sind solche Zwischenstufen wegen der invertierten terminalen Repetition nicht möglich. Für dieses Problem sind in den folgenden Modellen Lösungsmöglichkeiten vorgeschlagen worden:

- a) Zirkularisierung der DNA über die terminalen Proteine (Robinson und Bellet, 1974).

Solche zirkulären DNA-Proteinkomplexe spielen z.B. bei der Replikation von Φ X 174 (Langeveld et al., 1978, Eisenberg, 1980), Col E1 (Tomizawa et al., 1977) und SV 40 (Kasamatsu und Wu, 1976) eine Rolle. Allerdings konnten bei Adenoviren bisher keinerlei kovalent geschlossene zirkuläre replikative Zwischenstufen nachgewiesen werden. Lediglich komplette Virus-DNA ist aus Viruspartikeln (Robinson und Bellet, 1974, Rekosh et al., 1977) und aus Kernen infizierter Zellen (Girard et al., 1977) zumindest teilweise in ringförmigem Zustand isoliert worden. Diese ringförmigen Strukturen sind aber proteasesensitiv und verschwinden bei Behandlung mit Detergentien. Sie werden also nicht durch Ausbildung von Phosphodiesterbindungen sondern durch nichtkovalente Wechselwirkungen der hydrophoben terminalen Proteine erzeugt (Robinson und Bellet, 1974, Rekosh et al., 1977).

- b) Ein zweites Modell wurde von Rekosh et al. (1977) vorgeschlagen (s. Abb. 5):

Ein freies terminales Protein bindet nichtkovalent an das 3'-Ende eines parentalen DNA-Einzelstrangs und bindet außerdem kovalent ein Molekül Deoxycytidin oder Deoxycytidintriphosphat, dessen freie 3'-OH-Gruppe dann als Primer für die DNA-Synthese wirken könnte.

Dieses Modell wurde im Verlauf der letzten Jahre

unterstützt, als IN VIVO und IN VITRO Proteine an den molekularen Enden neu initiierteter Adenovirus-DNA nachgewiesen werden konnten (s. 1.6).

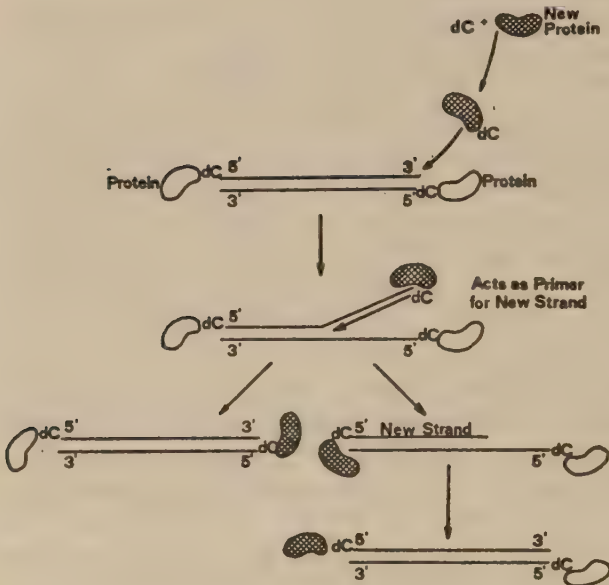


Abb. 5: Modell für die Initiation der Adenovirus-DNA-Replikation nach Rekosh et al. (1977). Das Modell ist im Text (1.4.4b) näher beschrieben.

1.5 Virusbildung

Zu späten Zeiten nach der Infektion erfolgt die Synthese großer Mengen viraler Strukturproteine, von denen aber nur 10- 20 % zur Virusbildung verwendet werden (Ginsberg und Dixon, 1961, Green, 1962, Wilcox und Ginsberg, 1963).

Schon während des Transports von den Polysomen zum Kern lagern sich die Polypeptide II bzw. III zu den entsprechenden Kapsomeren zusammen (Horwitz et al., 1969, Velicer und Ginsberg, 1970), wobei aus drei Ketten des Polypeptids II ein Hexonkapsomer (Horwitz et al., 1970, Franklin et al., 1971, Cornick et al., 1973, Jornväll et al., 1974) und aus 5 - 7 Ketten des Polypeptids III ein Pentonkapsomer wird (Wadell, 1970). Es ist unklar, ob diese Zusammenlagerung von selbst geschieht, wie Ergebnisse von Boulanger (1975) nahelegen, oder ob sie durch andere virale Proteine vermittelt wird. Für diese Möglichkeit sprechen Untersuchungen von Leibowitz und Horwitz (1975) mit den Adenovirusmutanten H5 ts17 und H5 ts20.

Aus den so entstandenen Kapsomeren und mindestens einem Teil der bereits erwähnten Strukturproteine scheint dann zunächst ein "leeres", das heißt DNA-freies Kapsid gebildet zu werden. Auf welche Weise das geschieht ist unbekannt. Ähnlich wie bei T4 und anderen Bakteriophagen (Murialdo und Becker, 1978) wird jedoch eine zelluläre Hilfsfunktion diskutiert (Heilman und Rouse, 1980).

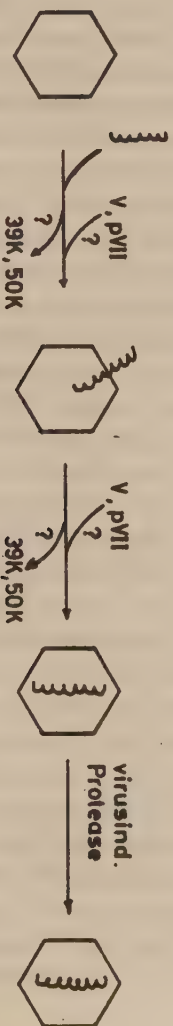
Leere Kapside treten bereits 13 Stunden nach der Infektion auf und lassen sich in Puls- und Puls-Chase-Experimenten als Vorläufer reifer Viruspartikel identifizieren (Sundquist et al., 1973, Ishibashi und Maizel, 1974). Die tatsächliche Proteinzusammenset-

zung dieser Partikel - wie auch der im folgenden diskutierten Zwischenstufen in der Virusmorphogenese - ist sehr umstritten. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß diese Virusvorläufer zumindest teilweise instabil sind und so je nach Isolierungsmethode unterschiedliche Werte resultieren. Die meisten Ergebnisse wurden aus Untersuchungen mit temperatursensitiven Mutanten gewonnen, bei denen die Viruszusammensetzung unter nichtpermissiven Bedingungen auf irgendeiner Stufe der Reifung unterbrochen ist. Virusvorläufer dieser Stufe sammeln sich dann an und können weiter charakterisiert werden. Bisher ist es allerdings erst in zwei Fällen gelungen solche Vorläufer nach Wechsel in den permissiven Temperaturbereich in reife, infektiöse Viruspartikel zu überführen (H2 ts1, Weber (1976) und H2 ts112, D'Halluin et al. (1978 a und b)). In anderen Fällen wurden Intermediate angehäuft, die unter permissiven Bedingungen nicht zu infektiösem Virus reiften. Die Frage, ob es sich hier um echte Reifungszwischenstadien handelt, bleibt also offen.

Im Augenblick wird folgender Weg für die Reifung von Adenoviren angenommen (s. Abb. 6):

Hexonkapsomere lagern sich zu Nonameren zusammen (Periera und Wrigley, 1974). Diese wiederum bilden zusammen mit Pentonkapsomeren ein sogenanntes Prokapsid, in dem auch noch die Strukturproteine IIIa, IV und die ungeschnittenen Vorläufer der Proteine VI und VIII (pVI und pVIII) vorkommen. Außerdem konnten zwei Gerüst- oder Reifungsproteine mit einem Molekulargewicht von 50000 bzw. 39000 d nachgewiesen werden. Die Prokapside sedimentieren mit 600 S und haben - nach Fixierung - eine Dichte von 1,3 bis 1,315 g/cm³ im CsCl-Gradienten (Edvardsson et al., 1976, D'Halluin et al., 1978a) bzw. von 1,306 g/cm³

Modell der Virusmorphogenese



Zeichnung der Zwischenstufen

Prokapsid, IM-Partikel

junge Virionen, NV-Partikel

reife Virionen CV-Partikel

Proteinzusammensetzung der Zwischenstufen

II, III, IIIa, IV, pVI, pVII, IX, X, 39K, 50K, keine Core-P.

wie Prokapside, ohne 39K u. 50K, + Core-P. V, pVII

vgl. Abb. 1

Eigenschaften: Sedimentation Dichte in CsCl Salzstabilität

600S
1,31 g/cm³
labil

labil

1,37
750S
1,345 g/cm³
stabil

750S
1,345 g/cm³
stabil

Abb. 6: Modell der Virusmorphogenese. Das Modell ist im Text beschrieben.

ohne Fixierung (Ishibashi und Maizel, 1974). In diese leeren Prokapside wird DNA eingeführt. Es resultieren Virusvorläufer mit einer Dichte von $1,370 \text{ g/cm}^3$ (D'Halluin et al., 1978a). Die nächste klar fassbare Zwischenstufe sind sogenannte junge Virionen mit einer Dichte von $1,345 \text{ g/cm}^3$ und einem Sedimentationskoeffizienten von 750 S. Sie haben schon die Proteinzusammensetzung reifer Virionen, enthalten aber statt der Proteine VI, VII und VIII noch deren ungeschnittene Vorläufer (Ishibashi und Maizel, 1974). Diese Vorläufer werden in einem letzten Reifungsschritt vermutlich durch eine virusspezifische Protease in ihre endgültige Struktur überführt (Weber, 1976, Bhatti und Weber, 1979). Das 50K- und das 39K-Protein werden wahrscheinlich vor oder während des DNA-Eintritts aus dem Kapsid ausgeschleust (D'Halluin et al., 1978a). Der Eintrittszeitpunkt der Core-Proteine V und pVII ist unbekannt, könnte aber nach dem Eintritt der DNA liegen (D'Halluin et al., 1978b).

Bei der Isolierung von Adenoviren findet man häufig defekte Viruspartikel, die neben Teilen des normalen, zum Teil allerdings umorganisierten Genoms zelluläre DNA enthalten (Burlingham et al., 1974, Daniell, 1976). Alle diese Partikel weisen Sequenzen vom linken Ende des viralen Genoms auf. Dasselbe Ergebnis liefert die Untersuchung von Viruspartikeln, die nur einen Teil des Genoms enthalten. Solche Partikel entstehen während der Virusisolierung durch Ultraschallbehandlung von Verpackungsintermediaten (D'Halluin et al., 1978a). Auch Untersuchungen an defekten Viruspartikeln (Hammarskjöld und Winberg, 1980) und Deletionsmutanten (T. Shenk, pers. Mitteilung) lassen eine Signalsequenz für die Verpackung am linken Genomende vermuten.

Im Lauf des Infektionszyklus werden auf diese Weise bis zu 5×10^5 Viruspartikel pro infizierte Zelle syn-

thetisiert. Während der Anhäufung virusspezifischen Materials geht der natürliche Ordnungszustand der Zelle mehr und mehr verloren bis schließlich der Zelltod eintritt, der die Virusfreisetzung ermöglicht (Lenk et al., 1980).

1.6 Das terminale Protein

Wird Adenovirus-DNA ohne Verwendung proteolytischer Enzyme isoliert, so erhält man DNA, an deren beiden Enden je ein Protein gebunden ist (Robinson und Bellet, 1974, Rekosh et al., 1977). Die DNA-Protein-Bindung ist stabil gegen chaotrope Agentien (Padmanabhan und Padmanabhan, 1977) aber labil gegen Alkalibehandlung (Carusi, 1977, Fütterer, 1978). Auch nach Protease-Behandlung sind die 5'-Enden der Virus-DNA gegen Phosphorylierung und 5'-Exonukleaseabbau blockiert (Carusi, 1977). Aufgrund der genannten Eigenschaften kann man schließen, daß das Protein kovalent an das jeweilige 5'-Ende der DNA gebunden ist. Für das Molekulargewicht seiner phosphorylierten Form wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein Wert von 55000 Dalton ermittelt (Rekosh et al., 1977). Über dieses Protein können DNA-Proteinkomplexe miteinander assoziieren, wobei DNA-Ringe oder Oligomere entstehen (Robinson und Bellet, 1974, Girard et al., 1977, Rekosh et al., 1977). Die Infektiosität von DNA-Protein-Komplexen ist 3 - 100mal so groß wie die proteinfreier DNA (Sharp et al., 1976, Chinnadurai et al., 1978, Estes, 1978). Auch an replikativen Zwischenstufen der Adenovirus-DNA-Synthese konnte IN VIVO (Fütterer, 1978, Horwitz et al., 1979, Coombs et al., 1979, van Wierlink et al., 1979) und IN VITRO (Reiter et al., 1980, Challberg et al., 1980, Stillman, 1980) ein terminales Protein nachgewiesen werden.

Über die genaue Funktion des Proteins ist noch nichts bekannt. Zur Diskussion steht nicht nur die erwähnte Schlüsselfunktion in Modellen zur Initiation der DNA-Replikation (s. 1.4.4). Ihm wird auch eine wichtige Rolle für den Schutz viraler DNA vor Abbau durch zelluläre Exonukleasen (Sharp et al., 1976) sowie für ihren Einbau in das Prokapsid zugeschrieben (Brown et al., 1975, Cordon et al., 1976). Eine Funktion bei der Regulation der Transkription oder der Integration viraler DNA in das Zellgenom wäre ebenso denkbar.

In den letzten Jahren wurden auch in zahlreichen anderen Systemen Nukleinsäure-Protein-Komplexe mit kovalenter Bindung gefunden:

a) RNA-Protein-Komplexe:

Das einzelsträngige RNA-Genom der Picornaviren (z.B. Poliovirus, Maul-und-Klauenseuchevirus) ist kovalent an ein hydrophobes Protein gebunden, das viruskodiert ist und ein Molekulargewicht von 120000 hat (Lee et al., 1976 und 1977, Sangar et al., 1977, Ambros und Baltimore, 1978). Dabei ist die RNA über ihren 5'-Uridylrest mit der OH-Gruppe eines Tyrosinrests des Proteins in einer Phosphodiesterbindung verknüpft (Ambros und Baltimore, 1978, Rothberg et al., 1978). Dieses Protein erscheint auch gebunden an genomkomplementäre (-)RNA und replikative Intermediate (Flangan et al., 1977, Nomoto et al., 1977a), nicht jedoch an mRNA, die sonst das gleiche 5'-Ende hat wie genomische RNA (Nomoto et al., 1977b). Dem Protein wird zum einen eine Funktion bei der RNA-Replikation (vermutlich bei der Initiation) und zum anderen beim Verpacken der RNA in das Viruspartikel zugeschrieben (Nomoto et al., 1977a).

Auch bei einigen RNA-haltigen Pflanzenviren konnten 5'-gebundene Proteine nachgewiesen werden, die meist für die Infektiosität der Nukleinsäure nötig sind (s. Tabelle 3).

Virus	Infektiosität der RNA ohne Protein	Literatur
Tobacco etch v.	+	Hari, 1981
Cowpea mosaic v.	-	Stanley et al., 1978
Tobacco ringspot v.	-	Harrison und Barker, 1980
Southern bean mosaic v.	-	Veerisetty und Sehgal, 1980
Squash mosaic v.	-	Daubert und
Echtes Ackerbohnen- mosaic V.	-	Bruening, 1979

Tab. 3: RNA-Pflanzenviren mit genomgebundenem terminalem Protein.

b) DNA-Protein-Komplexe

Kovalent gebundene Proteine wurden an replizierender DNA von SV 40 (Kasamatsu und Wu, 1976), ϕ X 174 (Eisenberg et al., 1977, Langefeld et al., 1978, Eisenberg, 1980) und in Plasmid-Relaxationskomplexen (Blair et al., 1971, Guiney und Helinski, 1975, Lovett und Helinski, 1975) gefunden. In allen diesen Fällen ist das Protein im Replikationsursprung an ein DNA-5'-Ende gebunden, das durch Spaltung einer spezifischen Bindung in einem doppelsträngigen DNA-Ring erzeugt wurde. Dieses Strukturelement könnte bedeutsam sein für die Aufwicklung superhelikal gewundener DNA-Doppelstränge oder als Start- oder Endpunkt einer Replikationsrunde dienen. In diesem Zusammenhang

wird auch eine Multifunktionalität solcher Proteine diskutiert (Eisenberg et al., 1977).

An den 5'-Enden von Zwischenstufen der Parvovirus H-I-DNA-Replikation wurde ebenfalls ein kovalent gebundenes Protein mit einem Molekulargewicht von 60 - 70 kd gefunden, das aber im reifen Virus noch nicht nachgewiesen wurde und für die Infektiosität der DNA nicht notwendig zu sein scheint (Revie et al., 1979).

Sehr ähnliche Verhältnisse wie bei Adenovirus liegen bei einigen Phagen von Bacillus subtilis vor. Besonders gut untersucht ist der Phage $\phi 29$. Dieser hat wie Adenovirus ein lineares, doppelsträngiges Genom mit einer - wenn auch nur sechs Basen langen - invertierten terminalen Repetition (Escarmis und Salas, 1981). An die jeweiligen 5'-DNA-Enden ist ein Protein kovalent gebunden (Salas et al., 1978, Yoshikawa und Ito, 1981). Die DNA-Replikation verläuft nach dem selben Modell, wie es für Adenovirus beschrieben wurde (s. 1.4.3) (Harding und Ito, 1980). An replikativen Intermediaten konnte ebenfalls ein Protein nachgewiesen werden (Harding und Ito, 1976, Sogo et al., 1982). Untersuchungen mit temperatursensitiven Mutanten wiesen es als viruskodiert aus (Yanowsky et al., 1976). Es ist sowohl für die DNA-Replikation als auch für die Transfektion notwendig (Harding et al., 1978, Mellado et al., 1980).

1.7 Aufgabenstellung

DNA-Protein-Komplexe wie die geschilderten scheinen molekularbiologisch von universeller Bedeutung zu sein; ihre Funktion ist allerdings noch weitgehend unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des terminalen Adenovirusproteins im Infektionszyklus - besonders bei der Initiation der DNA-Replikation und bei der Verpackung viraler DNA in Viruspartikel - zu untersuchen. Außerdem sollte festgestellt werden, ob es virus- oder zellkodiert ist.

2. Material

2.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ad X	Adenovirus Typ X
BND-Cellulose	Benzoylierte-Naphtoylierte-DEAE-Cellulose
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie ($1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10}$ Becquerel)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
d	Dalton
ddNTP	Dideoxynukleosidtriphosphat
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DMAPN	Dimethylaminopropionitril
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-Äthansulfonsäure
hpi	Stunden nach Infektion
H X tsY	temperatur-sensitive Mutante Nr. Y des menschlichen Adenovirus Typ X
K	Kilodalton
kd	"
min	Minute
moi	Multiplizität der Infektion
mRNA	Boten-RNA
M _r	Molekulargewicht
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x

PBS-d	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
pfu	plaquebildende Einheiten
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Svedberg-Konstante
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	DNA mit Einzelstranganteil
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
ts	temperatursensitiv

2.2 Zellen

HeLa-Zellen waren ein Geschenk von Dr. J. Williams,
Glasgow;

BHK 21- und Mm-Zellen waren ein Geschenk von Dr.
W. Doerfler, Köln;

TC7-Zellen waren ein Geschenk von Dr. E. Fanning,
Konstanz;

Mm-Zellen wurden außerdem von The American Type
Culture Collection, Rockville, Maryland,
bezogen.

2.3 Virusmaterial

Adenovirus Typ 2 war ursprünglich von Dr. W. Rowe,
NIH, Bethesda, Maryland erhalten worden.

Ad2ND1⁺ war ein Geschenk von Dr. E. Fanning, Konstanz.

2.4 Bakterien

Staphylococcus aureus, Cowan I war ein Geschenk
von Dr. E. Fanning, Konstanz.

Haemophilus parainfluenza, Rivers wurde von The
American Type Culture Collection, Rockville,
Maryland bezogen.

2.5 Seren und Medien

Flow Laboratories, Bonn: Kalbserum, foetales Kalbs-
serum.

Seromed: Ham's F 10-Medium

2.6 Chemikalien und andere Materialien

Folgende Chemikalien wurden von den aufgeführten
Firmen bezogen:

Amersham und Buchler, Braunschweig:

6-³H-Thymidin (22 - 30 Ci/mMol), Methyl-³H-Thymi-
din 5'-triphosphat (³H-dTTP) (30 Ci/mMol), ¹⁴C-Na-
triumformiat (50 - 60 mCi/mMol), ³²P-Orthophosphat
(30 - 100 Ci/mg), L-³⁵S-Methionin (780 Ci/mMol),
N-succinimidyl 3-(4-hydroxy, 5-(¹²⁵J)iodophenyl)pro-
pionate (Bolton-Hunter-Reagens) (mindestens
1600 Ci/mMol).

J.T. Baker Chemical Co, Philipsburg, New Jersey, USA:
Cesium Chloride (CsCl), Glycerin, Methanol.

Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu Isenburg:
EpaI-Restriktionsendonuklease

Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA:
Hydroxylapatit

Boehringer, Mannheim:

Adenosin-5'-triphosphat (ATP), 2'-Deoxy-adenosin-5'-triphosphat (dATP), 2'-Deoxy-cytidin-5'-triphosphat (dCTP), 2'-Deoxy-guanosin-5'-triphosphat (dGTP), 2'-Deoxy-thymidin-5'-triphosphat (dTTP), DNaseI, Hydroxyharnstoff, Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NAD), Thymidin.

Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, Ca., USA:
Haemin, Pansorbin.

Difco-Laboratories, Detroit, Michigan, USA:
Bacto-Pepton, Brain-Heart-Infusion, Yeast-Extract.

Flow Laboratories, Bonn:
Gentamycin

L'Industrie Biologique Française S.A.:
Agarose A 37 (Indubiose)

E. Merck AG, Darmstadt:

Äthylendinitrilotetraessigsäure (EDTA), Ammoniumperoxodisulfat, Ammoniumsulfat, Borsäure, Bromphenolblau, Chloroform, Coffein, Coomassie Brilliantblau R 230, Dimethylaminopropionitril (DMAPN), Dimethylsulfoxid (DMSO), 2,5-Diphenyloxazol(PP0), Formaldehyd, Glucose, Glycin, Guanidiniumhydrochlorid, Isoamylalkohol, Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumphosphat, Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumdesoxycholat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Phenol,

n-Propylamin, ProteinaseK aus Pilzen, Trichlor-
essigsäure (TCA), Triton X-100, Uranylacetat.

Miles Laboratories:

V8-Protease aus Staphylococcus aureus

Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala:

Sephadex CL4B, Sephadex G25 und G50.

C. Roth, Karlsruhe:

Dithiothreitol (DTT)

Schwarz und Mann, Orangeburg, New York, USA:

Guanidiniumhydrochlorid, Sucrose ultrapure.

Serva, Heidelberg:

Acrylamid, BND-Cellulose, N-2-Hydroxyethyl-pipera-
zine-N'-2-ethane-sulfonic acid (HEPES), Hydroxy-
harnstoff, 2-Mercaptoäthanol, N,N'-Methylbisacryl-
amid, Natriumsarkosyl, Phenylmethylsulfonylfluorid
(PMSF), Trifluortrichloräthan (Freon 113), Visking-
Dialysesschläuche.

Sigma Chemie, München:

Agarose, Ethidiumbromid, Rinderserumalbumin (BSA),
Streptomycinsulfat, Tris(hydroxymethyl)-aminome-
than (Tris).

Hatman Ltd., Springfield Mill, Maidstone, Kent., USA:

Glasfilter GF/A und GF/C, Phosphocellulose P11.

Zinsser, Frankfurt:

Quickscint 501

2.7 Lösungen und Medien

BND-A-Puffer: 250 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA pH 8.

BND-B-Puffer: 1M NaCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA.

BND-C-Puffer: BND-B-Puffer + 2 % Coffein .

Borat-Puffer: 50 mM Di-Natrium-tetraborat, 20 mM EDTA pH 8.

Dulbecco's Medium: beschrieben bei Dulbecco und Freeman, 1959.

Eagle's Medium (modifiziert): beschrieben bei Win- nacker, 1975.

Elektrophorese-Puffer für Agarose-Flachgele: 40 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 5 mM Na-Acetat.

Elektrophorese-Puffer für Agarose-Acrylamid-Misch- gele: 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM n-Propyl- amin, 0,5 % Sarkosyl.

Elektrophorese-Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gele: 50 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS.

hypotonischer HEPES-Puffer: 20 mM HEPES pH 7,4, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT.

isotonischer HEPES-Puffer: 0,22 M Sucrose, 50 mM HEPES pH 7,4, 1mM $MgCl_2$, 1 mM DTT.

L-Puffer: 1 % SDS, 10 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,1 mM PMSF.

NTPT-Puffer: 50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 0,01 % Triton X-100, 0,1 mM PMSF.

PI-Puffer: 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,05 % NP40.

PII-Puffer: 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5, 2 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100, 0,5 % Na-Desoxycholat, 0,05 % SDS.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS und PBSd): be- schrieben bei Dulbecco und Vogt, 1954.

PBS-Azid: PBS + 0,05 % Na-Azid.

Säulenpuffer für DNA-Protein-Komplex-Reinigung:

10 mM SDS, 10 mM Tris pH 7,9, 150 mM LiCl,
0,5 mM EDTA, 0,1 mM PMSE.

Säulenpuffer für die Abtrennung von ^{125}J nach

Tuszynski et al., 1980: 50 mM Tris pH 8, 100 mM
NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 0,1 % Sucrose,
0,01 % Triton X-100, 0,1 mM PMSE.

Scintillatorlösung:

- a) für nichtwässrige Proben: Quickscint 501,
Zinsser, Frankfurt.
- b) für wässrige Proben: 50 g Permablend III,
5 l Methanol, 5 l Toluol.

Tris-Salzlösung: beschrieben bei Winocour, 1963.

Alle Lösungen wurden in bidestilliertem Wasser an-
gesetzt.

Zur Einstellung von pH-Werten wurde bei Tris-Puffern
Salzsäure und bei HEPES- und EDTA-Puffern NaOH ver-
wendet.

3. Methoden

3.1 Zellkulturen

HeLa-Zellen wurden sowohl in Einschicht- als auch in Suspensionskulturen gezüchtet. Für die Einschichtkulturen diente Dulbecco's Medium als Nährlösung (Dulbecco und Freeman, 1959), während für die Suspensionskulturen ein modifiziertes Eagles Medium verwendet wurde (Eagle, 1959). Beide Medien wurden mit 10 % Kalbsserum komplementiert. Zur Verhinderung von Mycoplasmen-Verunreinigung wurde den zur Weiterpassage bestimmten Einschichtkulturen 50 µg/ml Gentamycin zugestzt. Das Passieren der Zellen erfolgte wie bei Kathmann (1974) beschrieben.

BHK-Zellen wurden wie HeLa-Zellen gehalten, jedoch enthielt das Nährmedium 5 % foetales Kälberserum. Bei Passagen wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 verdünnt.

TC 7-Zellen wurden in Dulbecco's Medium mit 10 % foetalem Kälberserum gezüchtet.

Mm-Zellen wurden in Ham's F10-Medium gehalten, das mit 20 % foetalem Kälberserum komplementiert wurde.

BHK-, TC 7- und Mm-Zellen wurden nur in Einschichtkulturen gezüchtet.

3.2 Virusvermehrung von Adenovirus Typ2 (Ad2)

3.2.1 Virusvermehrung in HeLa-Suspensionskulturen

HeLa-Zellen aus Suspensionskulturen in Glasgefäßen wurden bei einer Dichte von $2 - 5 \times 10^5$ Zellen/ml durch Zentrifugation und Resuspension in modifiziertem Eagle's Medium zehnfach konzentriert und

mit Ad2 infiziert (0,5 - 1 pfu/Zelle). Nach einer Adsorptionszeit von etwa einer Stunde wurden die Zellen mit Kulturmedium mit 2 % Kalbsserum auf das Originalvolumen verdünnt und 40 - 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation geerntet (4°C, 1000 g, 10 Minuten) und in etwa 1/200 Volumen sterilem Tris-Puffer (0,02 M, pH 8) aufgenommen. Der Aufschluß der infizierten Zellen erfolgte wie beschrieben (Doerfler, 1969, Rosenwirth et al., 1974): Sie wurden mit einem Bransom Sonifier beschallt (3x30 Sekunden, 65 mA, 0-4°C). Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (4°C, 1000 g, 10 Minuten) und der virushaltige Überstand entweder zur Isolierung von gereinigten Virionen weiterverarbeitet oder als Rohextrakt für weitere Infektionen bei -80°C eingefroren (Winnacker, 1975). Zur Isolierung von Viruspartikeln wurde der Überstand zweimal mit Trifluor-Trichlor-Äthan (Freon 113) extrahiert dann zu x ml Viruslösung x/2 g CsCl gegeben. Diese Lösung wurde zwei Stunden in einer Sorvall-Ultrazentrifuge (Modell OTD 50 bzw. OTD 2 bzw. OTD 65B, vertikaler Rotor TV 865) bei 48000 rpm und 4°C zentrifugiert. Bei dieser Gleichgewichtszentrifugation bilden die Viruspartikel eine weiße Bande, die durch Austropfen geerntet wurde. Zur weiteren Reinigung wurde diese Bande noch zweimal in einer gleichdichten CsCl-Lösung wie oben zentrifugiert. Gereinigtes Virus wurde bei 4°C aufbewahrt.

3.2.2 Virusvermehrung in HeLa-Einschichtkulturen

Diese Methode wurde nur zur Produktion von radioaktiv markiertem Virus verwendet:

Nahezu konfluente HeLa-Einschichtkulturen in Falcon-Flaschen (etwa 2×10^6 Zellen/Flasche) wurden mit einer 1 : 1 Mischung aus Tris-Salz-Lösung und Dulbecco's

Medium gewaschen und mit Ad2 (10 - 20 pfu/Zelle) in 2 ml der gleichen Lösung eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dieser Adsorptionszeit wurde die Viruslösung abgegossen und nach Zugabe von 40 ml Dulbecco's Medium mit 2 % Kalbsserum weiter bei 37°C inkubiert.

Zur Markierung mit ^3H -Thymidin wurde das Medium nach 6 Stunden auf 10 ml verringert und ^3H -Thymidin (5 - 20 $\mu\text{Ci/ml}$) zugegeben.

Zur Züchtung von ^{14}C -markiertem Virus wurde das Kulturmedium 4 Stunden nach der Infektion (hpi) auf 10 ml verringert und ^{14}C -Formiat (20 - 50 $\mu\text{Ci/ml}$) zugegeben.

Zur Züchtung von ^{32}P -markiertem Virus wurde das Medium 6 hpi durch 10 - 15 ml Nährmedium mit 1/10 der normalen Phosphatkonzentration ersetzt und ^{32}P -Orthophosphat zugegeben (100 - 250 $\mu\text{Ci/ml}$).

Zur Züchtung von ^{35}S -markiertem Virus wurde das Medium 8 - 12 hpi durch Nährmedium mit 1/30 der normalen Methioninkonzentration ersetzt (10 - 15 ml) und ^{35}S -Methionin (25 - 100 $\mu\text{Ci/ml}$) zugegeben.

40 - 48 hpi wurde das Medium abgegossen, der Zellrasen zweimal mit Tris-Salz-Lösung gewaschen und die Falconflaschen mit je 1,5 ml 0,02 M Trispuffer pH 8 bei -80°C eingefroren. Beim Auftauen wurden die Zellen durch Schütteln abgelöst und nach Ultraschallbehandlung und Freon-Extraktion radioaktiv markiertes Virus durch Gleichgewichtszentrifugation isoliert (s. 3.2.1).

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden 5 μl der Probe in 2 ml 5 %ige Trichloressigsäure gegeben und der Niederschlag nach 20 Minuten bei 4°C auf GF/C-Glasfiltern (Whatman) gesammelt. Nach Waschen der

Filter mit 5 %iger Trichloressigsäure und Äthanol wurden sie getrocknet, 5 ml Toluolszintillationsflüssigkeit zugegeben und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer ermittelt.

3.2.3 Virusvermehrung in BHK-, TC 7- und Mm-Zellen

Die Virusvermehrung in TC 7-Zellen erfolgte so wie für HeLa-Einschichtkulturen beschrieben. Zur Infektion wurde aber das Adenovirus-SV 40-Hybrid Ad2ND1⁺ (Lewis et al., 1969) und das unter 3.1 beschriebene Nährmedium für TC 7-Zellen verwendet. Ein Teil des Rohextrakts wurde nach Ultraschallbehandlung zur Verwendung als Inokulum für weitere Infektionen bei -80°C eingefroren.

Zur Virusvermehrung in BHK- und Mm-Einschichtkulturen wurden fast konfluente Zellrasen mit Ad2 infiziert (100 - 150 pfu/Zelle) wie unter 3.2.2 beschrieben. Die Inkubation erfolgte in den unter 3.1 für diese Zellen beschriebenen Kulturmedien. 20 hpi wurde das Nährmedium auf 10 - 15 ml verringert. Aus den infizierten BHK-Zellen wurde 40 - 44 hpi Virus geerntet, aus den Mm-Zellen 50 - 56 hpi. Neben den Zellrasen, die wie unter 3.2.2 beschrieben aufgearbeitet wurden, wurden auch die Kulturüberstände zur Gewinnung von Viruspartikeln verwendet: Ein CsCl-Stufengradient aus 2,5 ml mit einer Dichte von 1,5 g/cm³ und 1,5 ml mit einer Dichte von 1,2 g/cm³ wurde mit etwa 30 ml Kulturmedium überschichtet. Im Rotor AH627 wurde in 90 Minuten bei 4°C und 25000 rpm Virus in die CsCl-Phase sedimentiert, aus der er durch Gleichgewichtszentrifugation gereinigt wurde.

³²P-markierter Virus aus BHK-Zellen wurde analog der für HeLa-Zellen beschriebenen Methode isoliert.

3.3 Extraktion viraler DNA aus Viruspartikeln

3.3.1 Extraktion von proteinfreier DNA

Die Virussuspension in CsCl-Lösung wurde gegen BND-A-Puffer dialysiert und dann in Gegenwart von 0,5 % SDS für zwei Stunden bei 37°C mit Proteinase K behandelt (150 µg/ml). Es folgten zwei Extraktionen mit Phenol, das mit Borat-Puffer gesättigt war. Die wässrige Phase, die die DNA enthält, wurde durch ausgiebige Dialyse (3 - 4 mal je 2 l) gegen 50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4 oder gegen BND-A-Puffer vom Phenol befreit.

3.3.2 Extraktion und Reinigung eines DNA-Protein-Komplexes, der nur das terminale Protein enthält

Die Virussuspension in CsCl-Lösung wurde mit weiterem CsCl und mit Guanidiniumhydrochlorid auf 4 M Guanidiniumhydrochlorid bei einer Gesamtdichte von 1,468 g/cm³ eingestellt (Rekosh et al., 1977). Diese Lösung wurde in der Ultrazentrifuge (Rotor TV 865 oder bei größeren Volumina TV 865B) bei 18°C und 45000 rpm für 15 - 18 Stunden zentrifugiert und der entstandene Gradient durch Austropfen geerntet. Die DNA-haltigen Fraktionen wurden durch Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung oder nach Elektrophorese von Aliquots der Gradientenfraktionen auf Agarosegelen (s. 3.7) ermittelt. Die weitere Reinigung des DNA-Proteinkomplexes erfolgte durch Sedimentation in 5 - 20 % Sucrosegradienten in 4 M GuHCl, 20 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA und 0,1 mM PMSF (Rotor SW 41, 4°C, 30000 rpm, 15 h) oder durch Gelfiltration über eine Sephadex CL 4B-

Säule, wobei mit einem Puffer der Zusammensetzung 10 mM SDS, 10 mM Tris pH 7,9, 150 mM LiCl, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM PMSF eluiert wurde. Die Bestimmung der DNA-haltigen Fraktionen erfolgte durch Messung der Radioaktivitätsverteilung oder der optischen Dichte bei 260 und 280 nm oder durch Gelelektrophorese auf Agarosegelen (s. 3.7). Ein typisches Elutionsprofil zeigt Abbildung 7.

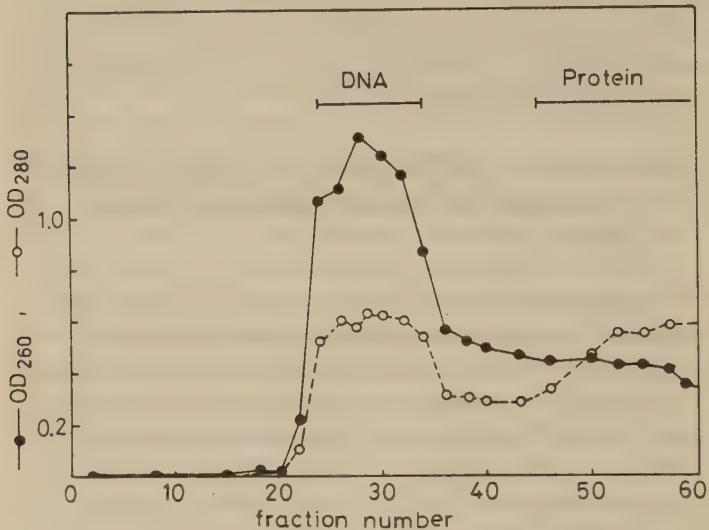


Abb. 7: Säulenchromatographische Reinigung eines DNA-Protein-Komplexes über Sephadex CL 4B.

3.4 Markierung viraler DNA in Ad2-infizierten Zellen

Petrischalen (50 x 13 mm) mit nahezu konfluentem HeLa-Zellrasen (etwa 2×10^6 Zellen pro Schale) wurden mit Ad2 infiziert (20 - 50 pfu/Zelle). 19 - 20 Stunden nach der Infektion - zur Zeit maximaler DNA-Synthese (Winnacker, 1975) - wurde das Medium auf

5 ml verringert und 100 μCi ^3H -Thymidin pro Schale zugegeben. In Pulsmarkierungsexperimenten wurde nach Ende der Markierungszeit bei 37°C (z.B. 7 min, 30 min, 4 h) das Medium abgegossen, der Zellrasen je zweimal mit eiskaltem PBSd und Tris-Puffer, der 10^{-4} M an PMSF war, gewaschen und jeweils 0,6 ml L-Puffer (1 % SDS, 10 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,1 mM PMSF) zugegeben. Lysis erfolgte in zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach Verdünnung mit einem gleichen Volumen TE-Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF) wurde das Lysat auf 10 - 30 % Sucrosegradienten gegeben, wobei bis zu 4×10^6 lyalisierte Zellen pro Gradient aufgetragen wurden. Die Gradienten bestanden aus einem Kissen von 2,5 ml 70 % Sucrose und 31 ml eines 10 - 30 % Sucrosegradienten (linear) in 1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA, 0,3 % Sarkosyl, 0,3 % Desoxycholat, 10 % Glycerin und 0,1 mM PMSF. Sie wurden in der Ultrazentrifuge (Rotor AH 627) 8 Stunden bei 18°C und 25000 rpm zentrifugiert und durch Austropfen geerntet. Eine typische Radioaktivitätsverteilung zeigt Abbildung 8.

Bei Puls-Chase-Experimenten wurde nach Beendigung der Pulszeit das radioaktive Medium durch 15 ml auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium mit 100 μM unmarkiertem Thymidin ersetzt. Nach der jeweiligen Chase-Zeit wurden die Zellen wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

Zur weiteren Reinigung und Konzentrierung der so isolierten DNA erfolgte noch eine Gleichgewichtszentrifugation in CsCl-GuHCl -Gradienten (s. 3.3.1).

Markierungsversuche mit Ad2-infizierten BHK- bzw. Mm-Zellen wurden in Falconflaschen durchgeführt. Nach Beendigung der Pulszeit wurden die Zellen durch

Einfrieren und Auftauen in 1,5 ml Tris (0.02 M, pH 8) von der Unterlage abgelöst und dann weiterverarbeitet wie oben beschrieben.

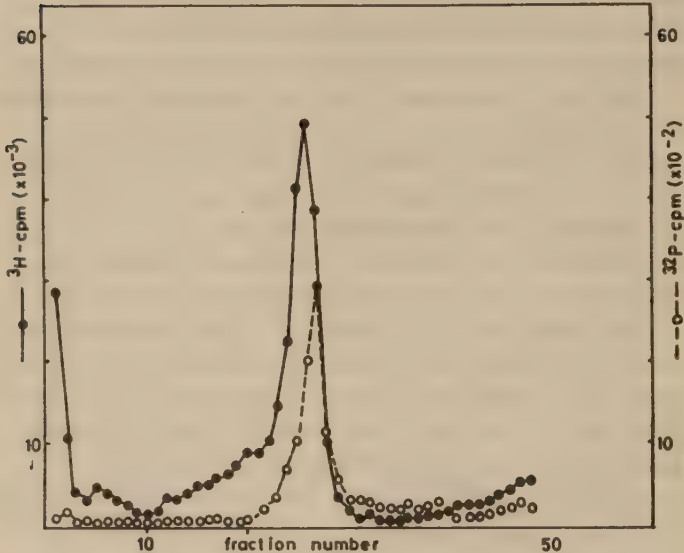


Abb. 8: Sedimentationsprofil intrazellulärer Ad2-DNA in 10 - 30 % Sucrosegredienten. Proteinhaltige, intrazelluläre virale DNA (—●—) sedimentiert etwas rascher als proteinfreie DNA aus Viruspartikeln (---○---).

3.5 Reinigung der Restriktionsendonuklease HpaI aus Haemophilus parainfluenza (Sharp et al., 1973, Mulder et al., 1974, Greene et al., 1978)

Der Bakterienstamm Haemophilus parainfluenza wurde in 8 l Flüssigmedium (37 g Brain-Heart-Infusion, 2 mg NAD, 10 mg Haemin pro Liter) angezüchtet. Es

wurden 40 g Bakterien erhalten (Naßgewicht). Alle folgenden Reinigungsschritte wurden bei 0 - 4°C durchgeführt.

40 g Bakterien wurden in 100 ml 25 mM Tris pH 7,4, 7 mM Mercaptoäthanol, 15 µg/ml PMSF suspendiert und in Intervallen insgesamt 30 Minuten ultraschallbehandelt, wobei die Temperatur unter 5°C gehalten wurde. Nach 25minütiger Zentrifugation im Sorvall SS34-Rotor bei 17000 rpm wurden 110 ml Überstand erhalten. Dazu wurden 14,4 ml 10 % Streptomycinsulfat in TM-Puffer (10 mM Tris pH 7,4, 7mM Mercaptoäthanol) gegeben und über Nacht stehen gelassen. Nach Zentrifugation wie oben wurde in zwei Stufen Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 25 bzw. 40 % zugegeben und jeweils nach 30 Minuten bei 17000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit weiterem Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 53 % eingestellt, über Nacht stehen gelassen und dann wie oben abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 10 ml TM-Puffer suspendiert und auf eine Sephadex G25-Säule gegeben, die mit TM-Puffer eluiert wurde. Es wurden 10 ml-Fraktionen gesammelt, deren Proteingehalt durch Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt wurde. 50 ml proteinhaltiges Eluat wurden mit Wasser auf 200 ml verdünnt, über Nacht gegen TM-Puffer mit 0,1 M KCl dialysiert und mit 40 ml pro Stunde auf eine Phosphocellulose-Säule (1,6 x 20 cm) gegeben. Die Elution erfolgte mit 400 ml eines linearen Gradienten von 0,1 - 0,6 M KCl. Das Eluat wurde in 10 ml-Fraktionen auf Enzymaktivität getestet (s. 3.6, 3.7). Die aktiven Fraktionen wurden direkt auf eine Hydroxylapatit-Säule (20 ml) gegeben, die mit TM-Puffer mit 0,2 M NaCl äquilibriert worden war. Enzym wurde mit 400 ml ei-

nes linearen Kaliumphosphatgradienten (0,01 M - 0,6 M Kaliumphosphat pH 7 in 1 mM EDTA, 7mM Mercaptoäthanol, 0,2 M NaCl) eluiert. 4 ml-Frak-tionen wurden auf Enzymaktivität getestet. Enzymhaltige Frak-tionen wurden gegen 20 mM Kaliumphosphat pH 7, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoäthanol und 50 % Glyzerin dialysiert und bei -20°C aufbewahrt.

3.6 Fragmentierung von Adenovirus-DNA mit Restrik-tionsendonukleasen

Zur Fragmentierung von Adenovirus-DNA wurden in ei-nem Gesamtvolumen von 50 - 1500 µl 1 - 10 µg DNA mit 5 - 20 µl der jeweiligen Restriktionsendonukle-ase gemischt und unter optimalen Bedingungen (s. Tabelle 4) 2 - 6 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA pH 8 gestoppt und das Reaktionsgemisch nach Einstellung auf 10 % Su-crose und 0,005 % Bromphenolblau gelelektrophore-tisch aufgetrennt.

Restriktionsenzym	Salzbedingungen	Temperatur
HpaI (wie unter 3.5 beschrieben gereinigt)	10 mM Tris pH 7,8 50 mM NaCl 10 mM MgCl ₂	37°C
HpaI (von BRL)	20 mM Tris pH 7,4 20 mM KCl 10 mM MgCl ₂	37°C
SmaI (gereinigt von T.Reiter 1980)	30 mM Tris pH 9,0 15 mM KCl 5 mM MgCl ₂	30°C

Bei der Fragmentierung von DNA-Proteinkomplexen wur-de zusätzlich 0,01 % Triton X100 und 0,1 mM PMSF zu-gegeben

Tab. 4: Bedingungen für die Fragmentierung von Ad2-DNA mit Restriktionsendonukleasen.

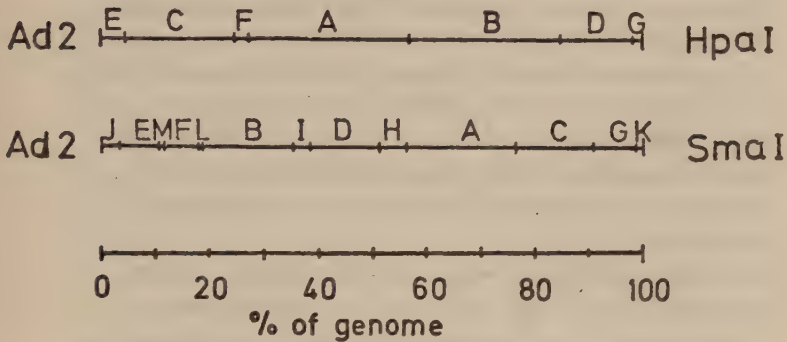


Abb. 9: Fragmentierungskarte der Ad2-DNA für die Restriktionsendonukleasen HpaI (Mulder et al., 1974) und SmaI (Sambrook et al., 1975).

Die jeweiligen Erkennungssequenzen sind:

HpaI : 5'-GTT/AAC-3'

SmaI : 5'-CCC/GGG-3'

3.7 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten auf Agarose-Gelen

Der Nachweis spezifischer Restriktionsendonukleasen in fraktionierten Bakterienlysaten erfolgte durch gelelektrophoretische Trennung der DNA-Restriktionsfragmente auf Agarose-Flachgelen (Sharp et al., 1973). Von den verschiedenen Säulenfraktionen wurden 5 µl-Aliquots mit jeweils 1 - 2 µg Ad2-DNA un-

ter den in Abschnitt 3.6 beschriebenen Bedingungen inkubiert. Bis zu 50 µl der Probe konnten in die Tasche eines Flachgels aufgetragen werden. Das Gel (1 % Agarose (Sigma)) enthielt neben 0,5 µg/ml Ethidiumbromid wie der Elektrophoresepuffer 40 mM Tris pH 8, 5 mM Natriumacetat und 1 mM EDTA (Hayward und Smith, 1972). Die Elektrophorese wurde für 2 - 5 Stunden bei 60 V und Raumtemperatur durchgeführt.

Diese Methode wurde auch zur Bestimmung von Adenovirus-DNA-Protein-Komplexen in Gradientenfraktionen benutzt (s. 3.3.2, 3.4). Im Gegensatz zu proteinfreier DNA kann unter den beschriebenen Bedingungen der DNA-Protein-Komplex nicht ins Gel eindringen, sondern bleibt an der Oberfläche liegen (Brown et al., 1975, Girard et al., 1977, Rekosh et al., 1977, Padmanabhan und Padmanabhan, 1977).

3.8 Gelelektrophorese von Adenovirus-DNA-Restriktionsfragmenten auf Agarose-Polyacrylamid-Mischgelen

Für die gelelektrophoretische Trennung von Ad2-DNA-Restriktionsfragmenten wurden Agarose-Polyacrylamid-Mischgele verwendet (Peacock und Dingman, 1968). Gel und Elektrophorese-Puffer (E-Puffer) enthielten 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 3 mM EDTA, 1 mM n-Propylamin und 0,5 % Sarkosyl. Die zylindrischen Mischgele wurden hergestellt wie beschrieben (Peacock und Dingman, 1968):

Eine 22 %ige Lösung von Acrylamid (Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid 19 : 1) wurde mit Indubiose, 10fach konzentriertem E-Puffer und Wasser

so gemischt, daß das Gel 0,8 % Indubiose und 1,5 % Acrylamid enthielt. Als Polymerisationsstarter diente Ammoniumpersulfat (0,04 %) und als Polymerisationskatalysator wurde 3-Dimethylaminopropionitril (DMAPN) zugegeben (0,32 %). Nach einer Polymerisationszeit von 1 bis 2 Stunden wurden die Stabgele (0,8 x 22 cm) einem Elektrophoresevorlauf von 1 bis 3 Stunden bei 50 V unterworfen (Winnacker, 1975), bevor die Probe (0,2 - 1,5 ml) auf das Gel aufgetragen wurde. Die Probe enthielt 10 % Sucrose und 0,001 % Bromphenolblau als Farbmarker. Nach einer Startphase von 30 bis 120 Minuten bei 20 V, in der sich das Probenvolumen im Gel konzentrierte, wurden die Gele in der anschließenden Trennphase für 9 bis 16 Stunden bei 50 V gehalten.

Nach der Elektrophorese wurden sie in Scheiben von 0,9 mm Dicke geschnitten und jede Scheibe in 0,6 ml 0,1 % SDS für 6 Stunden bei 37°C geschüttelt. Das so erhaltene Eluat wurde zur Radioaktivitätsbestimmung entweder quantitativ oder in Aliquots auf Whatman GF/A-Glasfilter aufgetrocknet.

Unter den hier beschriebenen Elektrophoresebedingungen unterschieden sich proteinhaltige Fragmente von ihren proteinfreien Derivaten durch verminderte Mobilität (Larsen und Nathans, 1977, Fütterer, 1978, Reiter et al., 1980).

3.9 BND-Cellulose-Chromatographie von Adenovirus-DNA

Die Trennung von doppelsträngiger DNA von DNA mit Einzelstranganteilen wurde mittels BND-Cellulose-Chromatographie durchgeführt. BND-Cellulose wurde von Serva, Heidelberg bezogen oder wie beschrieben präpariert (Gillam et al., 1967). Radioaktiv markier-

ter Ad2-DNA-Protein-Komplex aus infizierten Zellen wurde in BND-A-Puffer (250 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA) zwei Stunden mit Proteinase K behandelt (100 µg/ml) und eventuell noch vorhandene Proteine mit einem Gemisch aus Chloroform und Isoamylalkohol (24 : 1) extrahiert. (Ad2-DNA-Protein-Komplexe binden in detergensfreiem Puffer unabhängig vom Einzelstranganteil an BND-Cellulose (Stillman und Bellet, 1979).) Die proteinfreie DNA wurde auf eine BND-Cellulose-Säule (0,5 x 2 cm) aufgetragen und mit 6 x 1 ml BND-A-Puffer nachgewaschen. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte wie beschrieben (Winnacker et al., 1972, van der Eb, 1973). Erst wurde doppelsträngige DNA mit 6 x 1 ml BND-B-Puffer (1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA) und anschließend DNA, die einzelsträngige Anteile aufwies, mit BND-C-Puffer (2 % Coffein in BND-B-Puffer) von der Säule eluiert. Kontrollexperimente zeigen, daß bei dieser Methode sowohl die Bindung der DNA an die Säule als auch die getrennte spezifische Elution mit Ausbeuten zwischen 90 und 100 % erfolgen (Levine et al., 1970, Horwitz, 1976, Weingärtner, 1977).

3.10 Adenovirus-DNA-Replikation IN VITRO

3.10.1 Isolierung von Zellkernen aus Ad2-infizierten Zellen

HeLa-Zellen in 2 l-Suspensionskulturen wurden bei einer Zelldichte von $3 - 5 \times 10^5$ Zellen/ml mit Ad2 (50 - 100 pfu/Zelle) infiziert. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurde eine 2 M Hydroxyharnstoff-Lösung zu einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben. Die Zellsuspension wurde 18 - 20 hpi mit einem etwa

gleichgroßen Volumen tiefgekühlter Tris-Salzlösung (ca. -10°C) gemischt und die Lösung bei 1000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten bei $0 - 4^{\circ}\text{C}$. Das Sediment wurde dreimal mit Tris-Salzlösung gewaschen und in 20 ml hypotonischem HEPES-Puffer (20 mM HEPES pH 7,4, 1 mM MgCl_2 , 1 mM DTT) aufgenommen. Nach 15 Minuten wurden die angeschwollenen Zellen in einem Dounce-Homogenisator (Braun Melsungen) durch 10 Auf- und Abbewegungen des Dounce-Kolbens lysiert. Das Homogenat wurde bei 1000 g für 5 Minuten abzentrifugiert. x ml Niederschlag wurden in $0,75x$ ml isotonischem HEPES-Puffer aufgenommen (0,22 M Sucrose, 50 mM HEPES pH 7,4, 1 mM MgCl_2 , 1 mM DTT). Aliquots von 0,75 ml wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.10.2 Präparation von Kernextrakten

Ein Aliquot der eingefrorenen Zellkerne (0,75 ml) wurde innerhalb einer Stunde langsam bei 0°C aufgetaut. Nach Zugabe von $5\text{ }\mu\text{l}$ 5 M NaCl wurde die Kernsuspension 1 Stunde bei 0°C inkubiert. Durch Phasenkontrastmikroskopie wurde festgestellt, daß die Zellkerne bei dieser Behandlung ihre typische Morphologie nicht ändern. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 15000 g wurde der klare, nicht viskose Überstand mit einer Pasteurpipette abgenommen und bei 0°C aufbewahrt. Die IN VITRO-DNA-Syntheseaktivität dieser Extrakte war mindestens 24 Stunden stabil.

Die Proteinkonzentration, die nach Lowry et al. (1951) bestimmt wurde, betrug bei Kernextrakten aus infizierten und uninfizierten Zellen zwischen 5 und 10 mg/ml (Reiter, 1980).

3.10.3 DNA-Replikation IN VITRO

Für den in dieser Arbeit angewendeten Test für die DNA-Replikation IN VITRO wurden die von Winnacker (1975) beschriebenen Bedingungen für die Ad2-DNA-Replikation in isolierten Zellkernen mit kleinen Veränderungen übernommen. Das Replikationssystem ist dem von Challberg und Kelly (1979 a und b) beschriebenen System sehr ähnlich. Der Standardansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 0,3 ml:

- 30 mM HEPES pH 7,4
- 5 mM $MgCl_2$
- 5 mM KCl
- 15 mM Sucrose
- 15 μM 3H -dTTP (entspricht 1 μCi)
- je 60 μM dATP, dCTP, dGTP
- 2 mM ATP
- 1 mM DTT
- 2,5 μg Ad2-DNA-Protein-Komplex
- 75 μl Kernextrakt
(Reiter, 1980)

Das Reaktionsgemisch wurde bei 30°C inkubiert. Zur Isolierung des Reaktionsproduktes als DNA-Protein-komplex erfolgte eine Gleichgewichtszentrifugation in einem $CsCl$ - $GuHCl$ -Gradienten wie unter 3.3.2 beschrieben.

3.11 Gelelektrophorese von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen (Lämmli, 1970, Studier, 1973)

3.11.1 Gele und Proben

Auftrennung von Proteingemischen erfolgte auf Trenngelen von 10 oder 26 cm Länge und 1,5 mm Stärke. Die

Trenngele enthielten 0,378 M Tris pH 8,8, 0,1 % SDS und 10, 12,5 oder 15 % Acrylamid. Das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid war 30 : 0,8. Als Polymerisationsstarter wurden 100 µl 10 % Ammoniumpersulfat und als Polymerisationskatalysator 100 µl N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin zugegeben. Vor dem Polymerisationsstart wurde die Gellösung für 10 Minuten im Wasserstrahlvakuum entgast. Nach dem Gießen wurde die Lösung mit etwa 2 ml 0,1 % SDS vorsichtig überschichtet, wodurch eine gerade Gelloberfläche erhalten wurde. Nach einer Polymerisationszeit von 1 bis 2 Stunden wurde die SDS-Lösung vom erstarrten Trenngel abgegossen und das Trenngel mit einem Obergel von 3 - 8 cm Länge überlagert. Die Obergel enthielten 0,126 M Tris pH 6,8, 0,1 % SDS und 5 % Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid = 30 : 0,8). Die Obergellösung wurde ebenfalls entgast. Der Polymerisationsstart erfolgte wie oben beschrieben.

Die Proben wurden auf 0,3 % SDS, 50 mM Tris pH 6,8, 0,5 % Mercaptoäthanol, 10 % Glyzerin und 0,001 % Bromphenolblau eingestellt und vor dem Auftragen 3 Minuten gekocht.

Der Elektrophorese-Puffer enthielt 50 mM Tris, 190 mM Glycin und 0,1 % SDS. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 mA pro Gel bis das Bromphenolblau den unteren Gelrand erreichte.

3.11.2 Proteinnachweis im Gel

Anfärben: Die Gele wurde 4 Stunden in 200 ml Coomassie-Blau in 50 % TCA angefärbt und dann in 12 - 18 Stunden in 3 x 200 ml 30 % Methanol und 7 % Essigsäure entfärbt.

Fluorographie: (Bonner und Laskey, 1974, Laskey und Mills, 1975). Gele wurde direkt nach der Elektrophorese zweimal für 30 Minuten in je 15 Volumen DMSO gebadet und dann für 3 Stunden in 4 Volumen 22,2 % (w/v) PPO in DMSO inkubiert. Danach wurden die Gele etwa eine Stunde in 20 Volumen Wasser gelegt, wobei das eindiffundierte PPO im Gel ausfällt. Die so behandelten Gele wurden 2 Stunden im Vakuum unter Erhitzen getrocknet. ^{14}C - oder ^{35}S -markierte Proteine wurden dann wie unten beschrieben auf Röntgenfilmen nachgewiesen.

Autoradiographie: (Laskey und Mills, 1977). Radioaktiv markierte Proteine wurden autoradiographisch auf Kodak X-OMat AR Röntgenfilm in Verstärkerkassetten (Kodak X-Omatic oder DuPont Cronex (Quanta II)) nachgewiesen. Zum Teil wurden die Gele zuvor in 2 Stunden unter Erwärmen und Vakuum getrocknet. Die 6 Stunden bis 4 Wochen belichteten Filme (meist bei -80°C) wurden in Kodak D-19 Röntgenfilmentwickler in 5 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt und in Agfa-Gevaert Röntgen-Schnellfixierbad G334 in 5 Minuten fixiert.

3.12 Markierung des terminalen Proteins mit ^{125}I -Bolton-Hunter-Reagens

3.12.1 Proteinmarkierung (Bolton und Hunter, 1973)

Ad2-DNA-Protein-Komplexe aus Virionen oder infizierten Zellen wurden gegen 10 mM Natriumborat pH 8, 0,01 % Triton X-100 dialysiert, wobei 1 - 2 ml Probe 10 - 2000 μg DNA enthielten (entspricht maximal 0,05 - 10 μg terminalem Protein). Durch dreimal 20 Sekunden Ultraschallbehandlung wurde die DNA frag-

mentiert und die Probe durch Lyophilisation auf etwa 1/10 Volumen eingeengt. Diese Probe wurde in ein Gefäß gegeben, in dem zuvor 0,1 - 0,5 mCi ^{125}J -Bolton-Hunter-Reagens im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel Benzol befreit worden war. Die Reaktion erfolgte dann für 30 Minuten bei 0°C im Dunklen, wobei öfters geschüttelt wurde. Dann wurden 200 μl 0,3 M Glycin, 0,1 M Natriumborat, 0,1 % SDS zugesetzt und in weiteren 45 Minuten das nicht abreagierte Bolton-Hunter-Reagens mit Glycin umgesetzt.

3.12.2 Abtrennung von nicht proteingebundenem ^{125}J

Es wurden mehrere Methoden angewendet, um das nicht proteingebundene ^{125}J aus dem Ansatz zu entfernen:

- a) Dialyse gegen 5 x 1 l 50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 0,01 % Triton X-100, 0,1 mM PMSF (NTPT-Puffer).
- b) Gelfiltration über eine Sephadex G50-Säule (0,5 x 5 cm), wobei mit NTPT-Puffer mit 0,5 % SDS eluiert wurde.
- c) Gelfiltration nach Tuszynski et al., 1980: Eine 2 ml-Säule aus sterilem Sephadex G25 wurde durch 1,5minütige Zentrifugation bei 4500 rpm in einer Eppendorff-Tischzentrifuge von "ungebundenem" Säulenpuffer befreit (Säulenpuffer = 50 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 0,1 % Sucrose, 0,01 % Triton X-100, 0,1 mM PMSF). Nach Probenauftrag (maximal 50 μl) wurde erneut wie oben zentrifugiert. Der Durchfluß enthielt DNA-Protein-Komplex, von dem zumindest ein Teil des ungebundenen ^{125}J abgetrennt war.

Alle diese Methoden führten nur zu einer unbefriedigenden Abtrennung des ungebundenen ^{125}J , was auf starke Wechselwirkungen zwischen den sehr hydropho-

ben terminalen Proteinen und den hydrophoben Teilen des Bolton-Hunter-Reagens zurückzuführen sein könnte.

Vor der gelelektrophoretischen Untersuchung der Proteine wurde die anhaftende DNA in NTPT-Puffer mit 10 mM $MgCl_2$ mit 5 - 10 μg DNaseI verdaut. Einem Teil der Proben wurden nach der Jodierung 5 oder 10 μg Rinderserumalbumin (BSA) zugesetzt, um die ansonsten sehr geringen Proteinmengen (z.T. weniger als 50 ng in 400 μl) vor eventuell auftretenden Proteasen zu schützen.

3.13 Partielle Proteolyse mit V8-Protease aus *Staphylococcus aureus* (Cleveland et al., 1977)

Als Substrat für die partielle Proteolyse wurden jodierte DNA-Protein-Komplexe vor oder nach DNase-Behandlung eingesetzt: Zu 20 - 30 μl Probe wurden 5 μg BSA und 20 - 40 μg V8-Protease zugesetzt. Die Proteolyse erfolgte in 20 bis 40 Minuten bei 37°C in 125 mM Tris pH 6,8, 0,5 % SDS und 10 % Glycerin. Die Reaktion wurde durch fünfminütiges Kochen abgebrochen und die Proteinfragmente auf 15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (s. 3.11) (Cleveland et al., 1977 und 1978).

3.14 Isolierung und Charakterisierung junger Virionen

3.14.1 Isolierung junger Virionen (Edvardsson et al., 1978)

HeLa-Zellen wurden 20 - 24 hpi von Pasteurschalen abgekratzt, zweimal mit kaltem PBSd gewaschen und 10 Minuten in 10 mM Tris pH 7,4, 10 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$ bei einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml bei 0°C quellen gelassen. Dann wurde auf 0,8 % Triton X-100 eingestellt und im Dounce-Homogenisator

durch zehnmaliges Auf- und Abbewegen des Homogenisier-Kolbens die Zellmembran aufgebrochen. Nach Addition von 100 mM NaCl wurden die Kerne in 10 Minuten bei 1000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf 20 mM EDTA eingestellt und als "cytoplasmatischer Überstand" aufbewahrt. Der Niederschlag wurde in einer Konzentration von 1×10^7 Kerne/ml in 50 mM Tris pH 7,4, 10 mM EDTA, 0,3 M Ammoniumsulfat suspendiert, sofort in einem Dounce-Homogenisator durch dreimaliges Auf- und Abbewegen des Kolbens aufgebrochen und mit dem doppelten Volumen 50 mM Tris, 10 mM EDTA verdünnt. Diese Suspension und der cytoplasmatische Überstand wurden 10 Minuten bei 16000 g zentrifugiert und die erhaltenen Überstände als Kern- bzw. Cytoplasmaextrakt weiterverarbeitet. Die Auftrennung dieser Extrakte erfolgte durch Sedimentation in 25 - 40 % Sucrosegradienten in 50 mM Tris pH 7,4, 200 mM NaCl und 10 mM EDTA. Die Zentrifugation erfolgte im Rotor AH627 bei 25000 rpm in 2 Stunden. Alle Reinigungsschritte wurden bei 0 - 4°C durchgeführt.

Die radioaktive Markierung der jungen Virionen erfolgte in Puls- und Puls-Chase-Experimenten mit ^3H -Thymidin und ^{35}S -Methionin wie unter 3.2.2 beschrieben.

3.14.2 Charakterisierung der jungen Virionen

3.14.2.1 Dichtebestimmung junger Virionen

Aliquots der verschiedenen Sucrosegradientenfraktionen wurden in vorgeformten (Dichte $1,29 - 1,38 \text{ g/cm}^3$) oder selbstgenerierenden (mittlere Dichte $1,34 \text{ g/cm}^3$) CsCl-Gradienten in 3 Stunden ins Gleichgewicht zentrifugiert. Die Gradienten wurden durch Austropfen geerntet, die Radioaktivitätsverteilung bestimmt und

die Dichte der einzelnen Fraktionen durch Messung des Brechungsindex bei 20°C ermittelt.

3.14.2.2 Bestimmung der DNase-Sensitivität junger Virionen

Je 20 µl der Sucrosegradientenfraction, die die jungen Virionen enthielt, wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl 50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 10 mM MgCl₂ für 10 - 90 Minuten mit 5 µg DNaseI bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt (s.3.2.2).

Eine gleiche Testreihe wurde mit einer Probe durchgeführt, die zuvor 5 Minuten auf 50°C erhitzt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt worden war.

3.14.2.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Junge Virionen und Prokapside wurden aus den entsprechenden Gradientenfractionen an einen Nitrocellulose-Film auf einem Kupfergitter adsorbiert. Der Film wurde mit Wasser gewaschen und die Partikel mit 0,2 M Uranylacetat negativkontrastiert. Die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde mit einem Zeiss-EM 109.

3.15 Gewinnung eines Antiserums gegen das terminale Protein

3.15.1 Immunisierung

Die Immunisierung erfolgte mit DNA-Protein-Komplex aus Virionen, der über zwei Gleichgewichtszentrifu-

gationen und eine Sephadex CL-4B-Säule (1,5 x 85 cm) gereinigt und durch Ultraschallbehandlung fragmentiert worden war (s. 3.3.2).

Einem Meerschweinchen, dem zuvor 2 ml Herzblut entnommen worden waren, wurden 200 µl dieser Probe mit 200 µl Freund'schem Adjuvans intracutan am Rücken eingespritzt. Nach 14 Tagen wurde diese Prozedur wiederholt. Der DNA-Gehalt der Proben entsprach einer Proteinmenge von maximal etwa 7 µg. 20 Tage nach der zweiten Immunisierung wurden 2 ml Herzblut entnommen, aus denen das Antiserum AS-I gewonnen wurde.

10 Wochen nach der zweiten Immunisierung wurde eine dritte Probe wie oben injiziert, wobei auf das Adjuvans verzichtet wurde. 4 Wochen nach dieser dritten Immunisierung wurden erneut 2 ml Herzblut entnommen, aus denen das Antiserum AS-II gewonnen wurde.

3.15.2 Gewinnung von Antiseren

Das entnommene Blut wurde 2 Stunden bei 37°C und dann 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert und zweimal 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden für Immunpräzipitationen verwendet. Es wurden ein Präimmunsereum PIS und zwei Immunsereen AS-I und AS-II gewonnen.

3.16 Isolierung und Fixierung von Staphylococcus aureus, Cowan I (Kessler, 1975)

Staphylococcus aureus wurde in einem Kulturmedium aus 10 g Bacto-Pepton, 5 g Hefe, 8 g NaCl und 5 g Glukose bei 37°C gezüchtet. Angeimpft wurden 800 ml

dieses Mediums mit 15 ml einer Vorkultur. Nach 24 Stunden wurden die Bakterien im GS3-Rotor in 15 Minuten bei 4000 rpm abzentrifugiert und zweimal mit PBS mit 0,05 % Natriumazid (PBS-Azid) gewaschen. Dazu wurden sie jeweils suspendiert und bei 7000 rpm im GSA-Rotor abzentrifugiert. Auf diese Weise wurden 3,8 g Staphylococcus aureus erhalten, die in 38 ml PBS-Azid aufgenommen wurden. Nach Zugabe von 2,275 ml Formaldehyd wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, die fixierten Bakterien abzentrifugiert und einmal mit PBS-Azid gewaschen. Die verbliebenen 2,8 g Bakterien wurden in 28 ml PBS-Azid aufgenommen, in einem Erlenmeyerkolben mit großem Boden 5 Minuten auf 80°C erhitzt und sofort auf 0°C abgekühlt. Die so abgetöteten Bakterien wurden zweimal in PBS-Azid gewaschen. Es wurden so 1,4 ml abgetötete und fixierte Bakterien erhalten, die in 12,6 ml PBS-Azid aufgenommen und in 0,7 ml-Portionen bei -20°C eingefroren wurden.

3.17 Immunpräzipitationen

1 - 3 ng radioaktiv markiertes Protein (20000 - 50000 cpm) in 50 µl Präzipitationspuffer (PI-Puffer oder PII-Puffer, s. unten) wurden mit 20 µl Kälberserum versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Addition von 20 µl fixiertem Staphylococcus aureus (s. 3.16) oder Pansorbin (Serva) wurde weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann 15 Sekunden in einer Eppendorff-Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand dieser Vorfällung wurde mit 10 µl Immun- oder Präimmuns serum (s. 3.15) entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Die Präzipitation eines eventuell entstandenen Antigen-

Antikörper-Komplexes erfolgte mit Staphylococcus aureus oder Pansorbin wie oben beschrieben. Der Niederschlag wurde zweimal mit dem jeweiligen P-Puffer gewaschen, in Probenpuffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 3.11) aufgenommen und 5 Minuten gekocht. Nach Abzentrifugieren der Bakterien wurde der Überstand in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. In einigen Versuchen wurde auf die Vorfällung mit Kälberserum verzichtet.

PI-Puffer: 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA;
0,05 % NP 40

PII-Puffer: 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5, 2 mM
EDTA, 0,5 % Triton X-100, 0,5 % Desoxy-
cholat, 0,05 % SDS

4. Ergebnisse

4.1 Verhalten von proteinhaltigen Adenovirus-DNA-Fragmenten auf Agarose-Acrylamid-Mischgelen

Bei früheren gelelektrophoretischen Untersuchungen von Adenovirus-DNA-Restriktionsfragmenten wurden stets Gelsysteme verwendet, in denen nur proteinfreie Fragmente aufgetrennt werden konnten. Terminale Fragmente mit kovalent gebundenem Protein drangen nicht in wässrige, gepufferte Agarose-Gele (0,5 - 1 %) ein (Padmanabhan und Padmanabhan, 1977, Rekosh et al., 1977, Girard et al., 1977). Für die hier dargestellten Versuche wurden detergentshaltige Agarose-Acrylamid-Gele entwickelt, in denen auch proteinhaltige Fragmente wandern können. Ihre Beweglichkeit ist jedoch gegenüber den entsprechenden proteinfreien Fragmenten verringert (Larsen und Nathans, 1977, Fütterer, 1978, Reiter et al., 1980).

³H-markierte Adenovirus Typ2-DNA mit terminalem Protein wurde isoliert und fragmentiert wie beschrieben (s. 3.3.2 und 3.6). Vor der Verdauung mit Restriktionsenzymen wurde proteinfreie, ³²P-markierte Ad2-DNA zugesetzt. Die erhaltenen Restriktionsmuster in Agarose-Acrylamid-Mischgelen (s. 3.8) waren für die internen Fragmente identisch, während die proteinhaltigen terminalen Fragmente gegenüber den proteinfreien leicht verschoben waren. Diese Verschiebung verschwand, wenn die Fragmente vor der Auftrennung mit ProteinaseK behandelt wurden (s. Abb. 10 und 11). An den Gelorten der terminalen Fragmente E₁ und G₁ (bei Verdauung mit dem Enzym HpaI) wurden 4,4 bzw. 1,3 % der Gesamtradioaktivität gefunden. Diese Werte

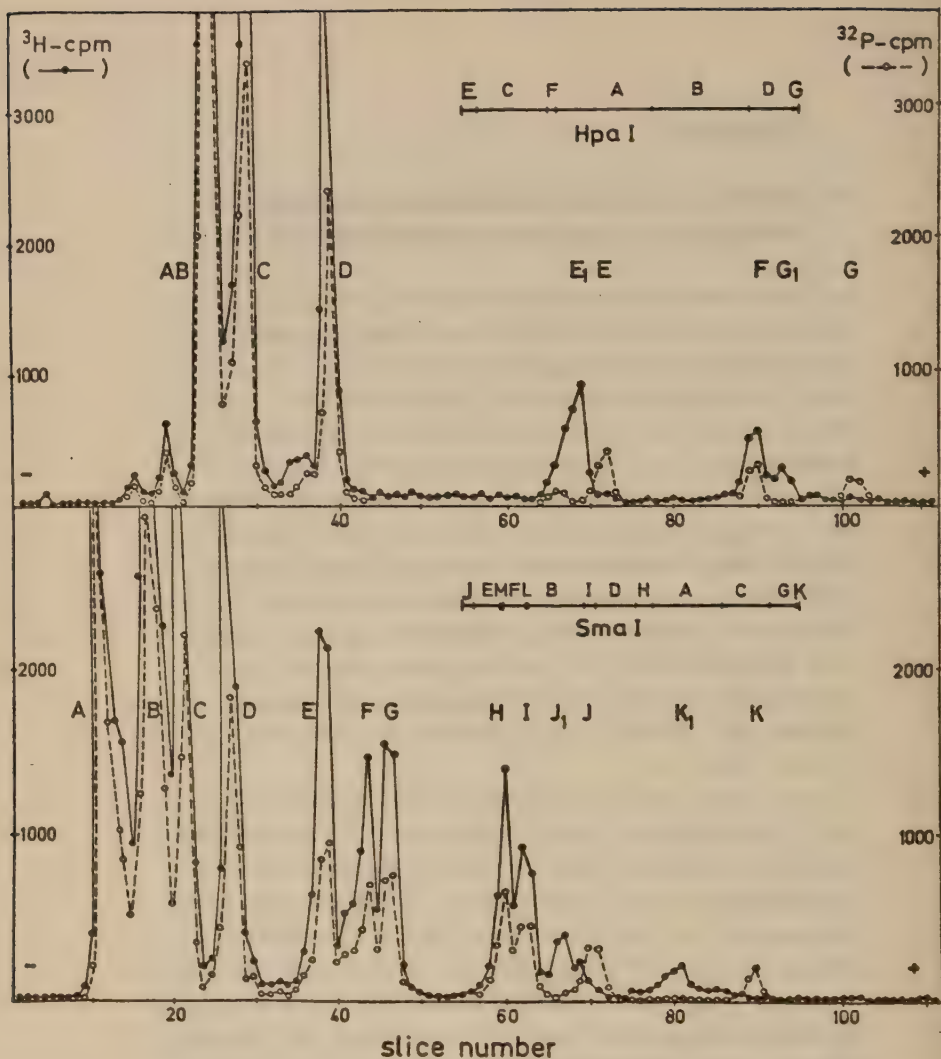


Abb. 10: Restriktionsmuster von Ad2 DNA-Protein-Komplex aus Virionen nach Verdauung mit HpaI (oben) und SmaI (unten).
 —●— proteinhaltige DNA (^3H -markiert)
 ---○--- proteinfreie DNA (^{32}P -markiert)
 Die Positionen der terminalen proteinhaltigen DNA-Fragmente sind mit dem Index 1 gekennzeichnet.

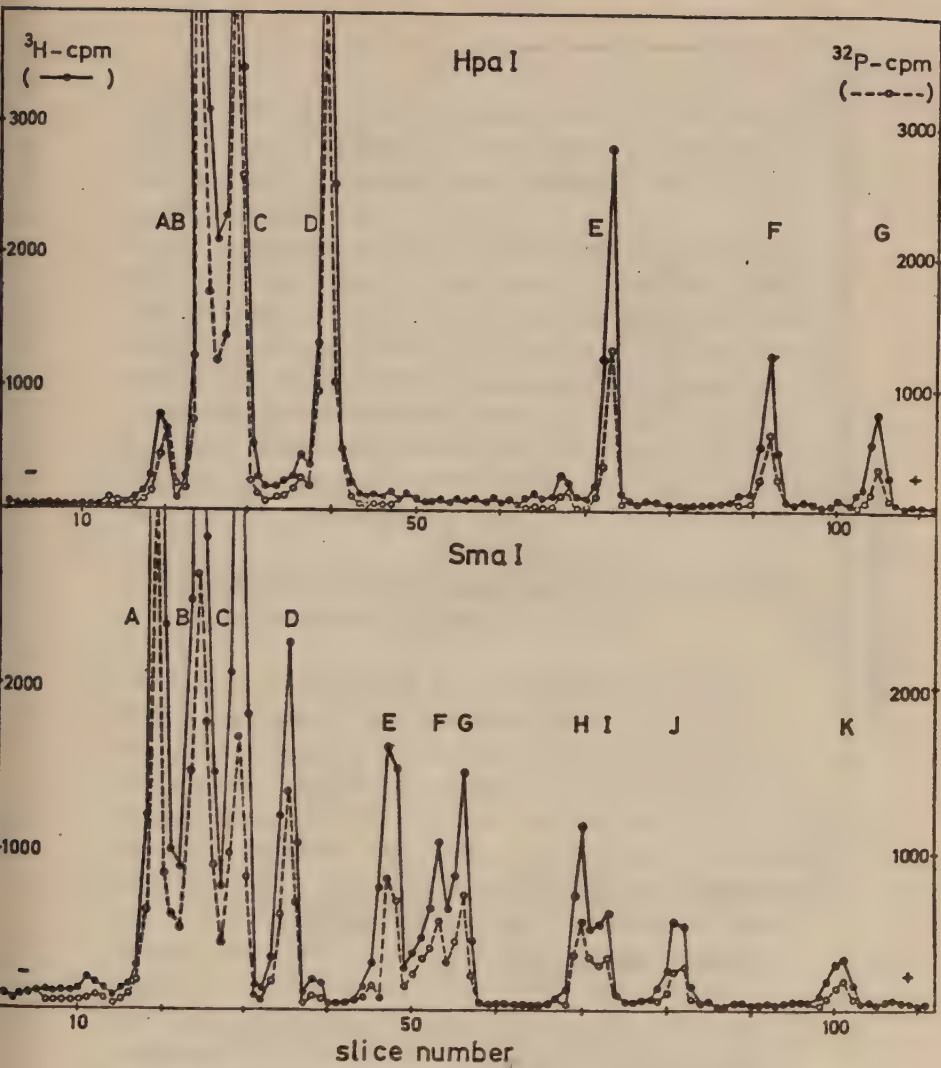


Abb. 11: Restriktionsmuster von Ad2 DNA-Protein-Komplex nach Verdauung mit HpaI (oben) und SmaI (unten) und anschließender ProteinaseK-Behandlung. Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde hier das Fragmentgemisch (vgl. Abb. 10) eine Stunde mit 25 μg ProteinaseK behandelt.

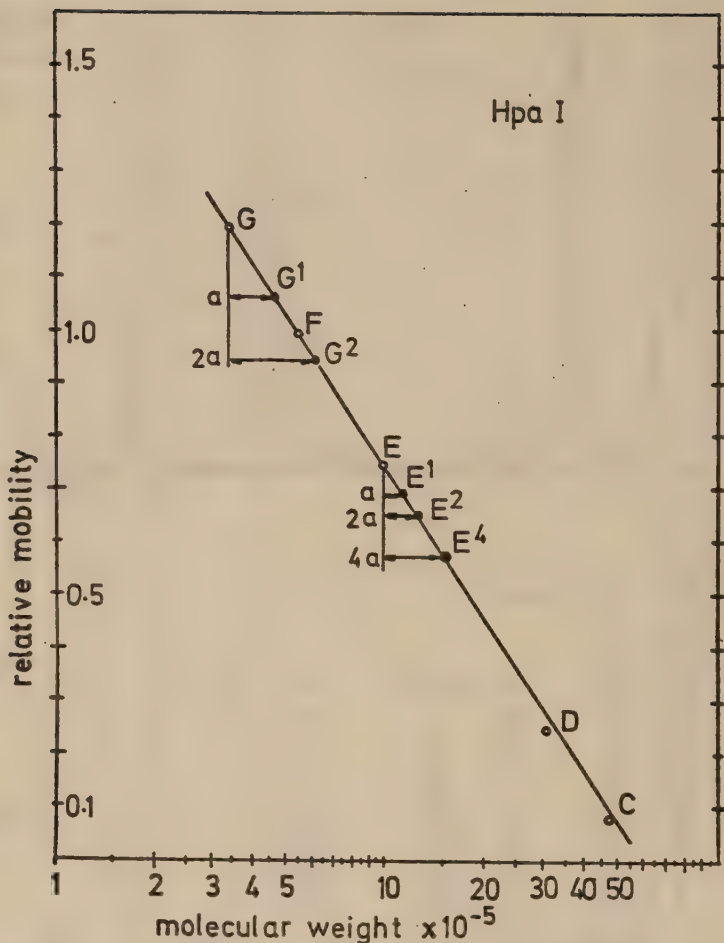


Abb. 12: Relative Beweglichkeit der Ad2-DNA-HpaI-Restriktionsfragmente. Aus den Positionen der Fragmente in Agarose-Polyacrylamid-Mischgelen wurde ihre relative Beweglichkeit errechnet, wobei als Standard die Strecke zwischen den Positionen von AB und F gleich 1, gesetzt wurde. Die Bezeichnungen E und G₁ beziehen sich auf die proteinhaltigen terminalen DNA-Fragmente aus Viruspartikeln (s. Abb. 10), während sich die Bezeichnungen E₂, E und G₂ auf die proteinhaltigen Fragmente aus 4h-pulsmarkierter DNA aus infizierten Zellen beziehen (s. Abb. 14). Großbuchstaben ohne Index bezeichnen proteinfreie Fragmente. Die Verschiebung a beträgt 135000 Dalton.

liegen sehr nahe bei den theoretisch zu erwartenden von 4,5 bzw. 1,5 %, so daß von einem quantitativen Nachweis der proteinhaltigen Fragmente im Gel ausgegangen werden kann.

Da die Beziehung zwischen Fragmentgröße und Wanderungsgeschwindigkeit im Gel nicht linear ist, wurde zur Bestimmung der Verschiebung eine halblogarithmische Darstellung gewählt (s. Abb.12). Die Abbildung zeigt, daß durch die Proteinassoziation beide Endfragmente um den gleichen Betrag a verschoben werden. Die Verschiebung entspricht in dieser Darstellung einem zusätzlichen DNA-Stück mit einem Molekulargewicht von 135000 Dalton.

4.2 Gelelektrophoretische Untersuchungen von Adenovirus-DNA aus infizierten Zellen

Wenn das von Rekosh et al. (1977) vorgeschlagene Modell der Adenovirus-DNA-Replikation zutrifft (s. Abb.5, 1.4.4), sollte an jedes neunitiierte DNA-Molekül von Anfang an das terminale Protein gebunden sein. Es müsste daher möglich sein, mit Hilfe des beschriebenen Gelsystems (s. 3.8) auch an gerade replizierenden bzw. an neusynthetisierten DNA-Molekülen ein solches Protein nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden Ad2-infizierte HeLa-Zellen 20 Stunden nach der Infektion mit ^3H -Thymin pulsmarkiert, und die virale DNA wie beschrieben über Sucrosegradienten isoliert (s. 3.4) (Girard et al., 1977, Keding et al., 1978). Die so gewonnene DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease HpaI verdaut und gelelektrophoretisch untersucht.

4.2.1 Untersuchung intrazellulärer viraler DNA aus Pulsmarkierungsexperimenten

Um ein möglichst großes Spektrum von DNA in unterschiedlichen Replikationsstadien untersuchen zu können, wurden Ad2-infizierte HeLa-Zellen 20 hpi für 7, 30 und 240 Minuten mit ^3H -Thymidin pulsmarkiert (s. 3.4). Die HpaI-Restriktionsfragmente der intrazellulären viralen DNA-Protein-Komplexe wurden auf Agarose-Acrylamid-Mischgelen elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 13 und 14).

Die Endfragmente der 7 Minuten markierten DNA sind deutlich gegenüber ihren proteinfreien Gegenstücken verschoben. Die Peaks sind jedoch jeweils sehr breit, so daß eine verlässliche Bestimmung der Verschiebung nicht möglich ist (s. Abb. 13a).

Bei DNA, die maximal 30 Minuten alt ist, zeigt sich ebenso wie beim 4 Stunden-Puls eine Verschiebung, die größer ist, als bei DNA-Fragmenten, die aus Virionen isoliert wurden (s. Abb. 13b und 14). Diese Verschiebung ist bei 30 Minuten markierter DNA etwa doppelt so groß wie für Virion-DNA. Bei 4 Stunden markierter DNA treten neben dem Hauptpeak bei der doppelten Verschiebung noch kleinere Peaks mit der

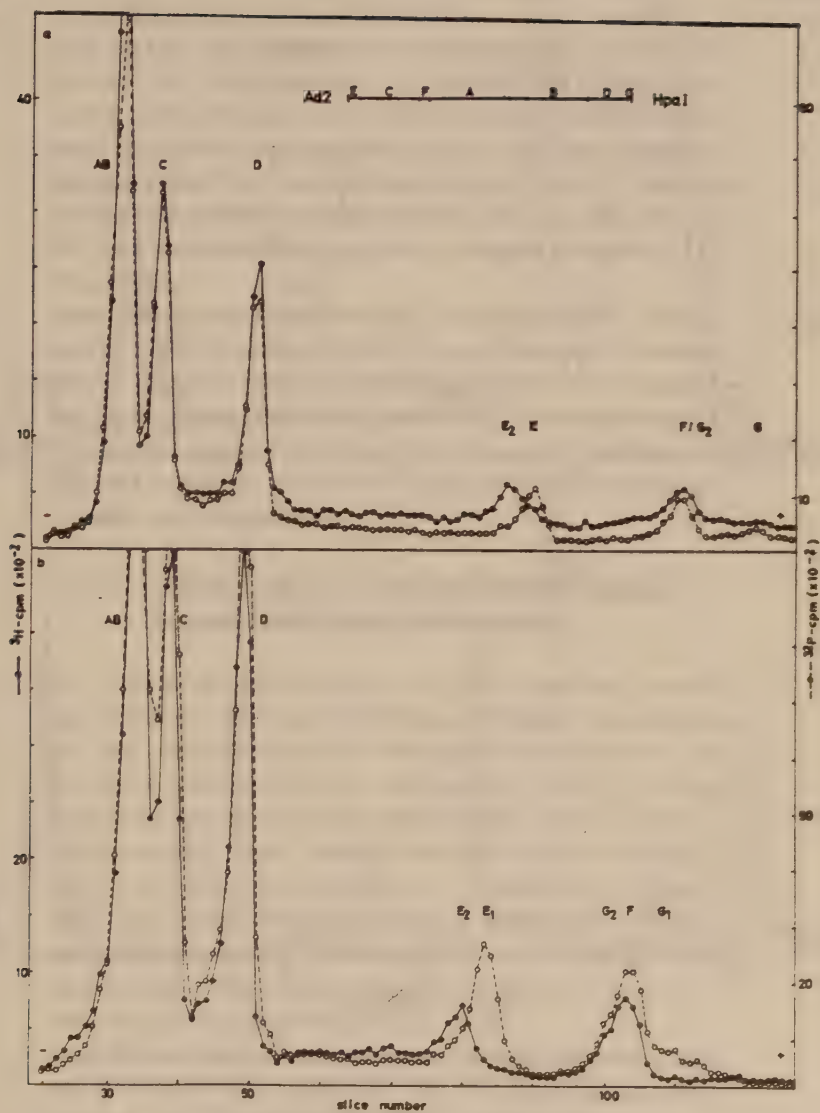
Abb. 13: HpaI-Restriktionsmuster pulsmarkierter Ad2-DNA aus infizierten HeLa-Zellen. Ad2-infizierte HeLa-Zellen wurden 20 hpi mit ^3H -Thymidin pulsmarkiert und die HpaI-Restriktionsfragmente der intrazellulären DNA-Proteinkomplexe auf detergenshaltigen Agarose-Acrylamid-Mischgelen aufgetrennt.

a) 7 Minuten Puls:

—●— pulsmarkierte DNA
---○--- proteinfreie Marker-DNA

b) 30 Minuten Puls:

—●— pulsmarkierte DNA
---○--- DNA-Protein-Komplex aus Viruspartikeln



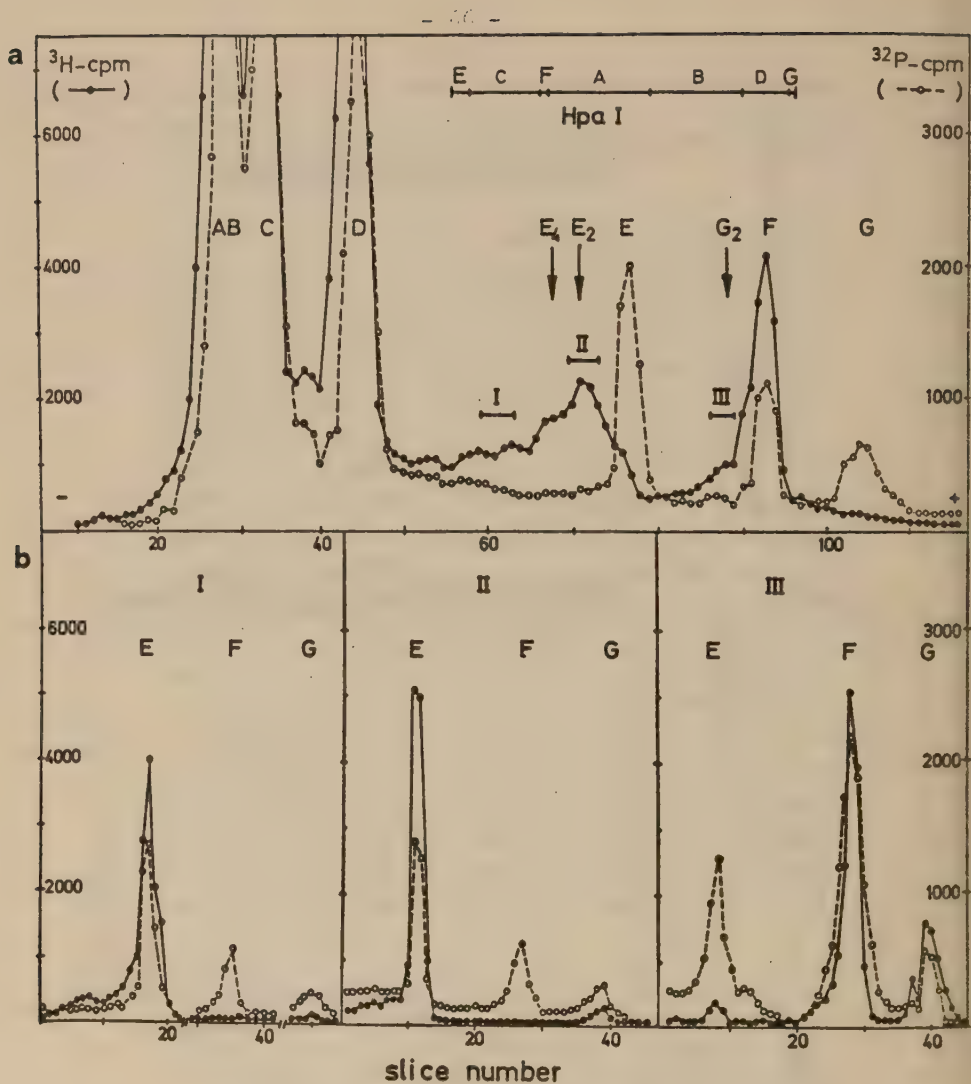


Abb. 14: HpaI-Restriktionsmuster 4 h pulsmarkierter Ad2-DNA aus infizierten HeLa-Zellen.

- a) —●— pulsmarkierte DNA
 - -○- - proteinfreie Marker-DNA
- b) DNA aus den Bereichen I, II und III wurde isoliert und nach Proteinase-K-Behandlung erneut elektrophoretisch untersucht. Es ist jeweils nur ein Ausschnitt aus den Gelen dargestellt.
 pulsmarkierte DNA + Prot.K
 proteinfreie Marker-DNA

etwa vier- und sechsfachen Verschiebung auf (s. Abb. 14 und 12). Das Material aus diesen Gelfraktionierungen wurde isoliert und nach ProteinaseK-Behandlung erneut gelelektrophoretisch untersucht. Dabei wurde gezeigt, daß DNA aus den Bereichen I und II aus proteinassoziiertem E-Fragment und DNA aus dem Bereich III aus proteinassoziiertem G-Fragment besteht (s. Abb. 14b).

Wenn DNA-Proteinkomplexe aus Viruspartikeln zusammen mit infizierten Zellen lysiert wurden, traten keine zusätzlichen Verschiebungen wie oben beschrieben auf. Diese sind also nicht auf intermolekulare Wechselwirkungen von Proteinen aus infizierten Zellen mit einem terminalen Protein wie aus Viruspartikeln zurückzuführen.

4.2.2 Untersuchung von intrazellulärer viraler DNA aus Puls-Chase-Experimenten

Mit diesem Versuch sollte ermittelt werden, inwieweit DNA mit den geschilderten größeren Verschiebungen der proteinhaltigen terminalen Fragmente in DNA mit Virioncharakteristik übergeführt wird. Auch der zeitliche Verlauf dieser Umwandlung sollte untersucht werden. Dazu wurden Ad2-infizierte HeLa-Zellen 19 hpi für 30 Minuten mit ^3H -Thymidin pulsmarkiert und dann für verschiedene Zeiten mit Medium ohne Radioaktivität inkubiert (s. 3.4). Anschließend wurden DNA-Protein-Komplexe isoliert und wie beschrieben aufgearbeitet (s. 3.8).

Nach 30 Minuten Chase war noch keine Änderung in der Verschiebung gegenüber der 30 Minuten pulsmarkierten DNA festzustellen. Die Analyse der markierten DNA durch BND-Cellulose-Chromatographie (s. 3.9) zeigt jedoch, daß sie keine Einzel-

stranganteile mehr aufwies, während nach dem 30 Minuten Puls noch etwa 25 % der DNA Einzelstranganteile enthielt, das heißt, gerade repliziert wurde (s. Abb. 15). Gerade fertiggestellte DNA enthält also ebenso das vermutlich größere terminale Protein wie die replikativen Zwischenprodukte (s. Abb. 16).

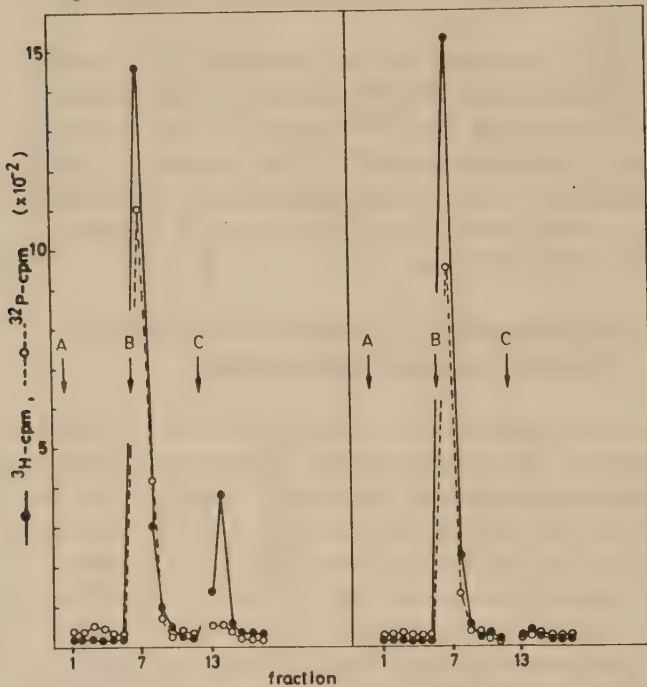


Abb. 15: BND-Cellulose-Chromatographie von puls- und puls-chase-markierter intrazellulärer viraler DNA (s. 3.9).

—●— intrazelluläre virale DNA
 ---○--- doppelsträngige Marker-DNA

a) 30 Minuten Puls

b) 30 Minuten Puls + 30 Minuten Chase

Der Wechsel der Elutionspuffer ist mit Pfeilen bezeichnet. ds-DNA eluiert mit BND-B-Puffer, ss-DNA mit BND-C-Puffer.

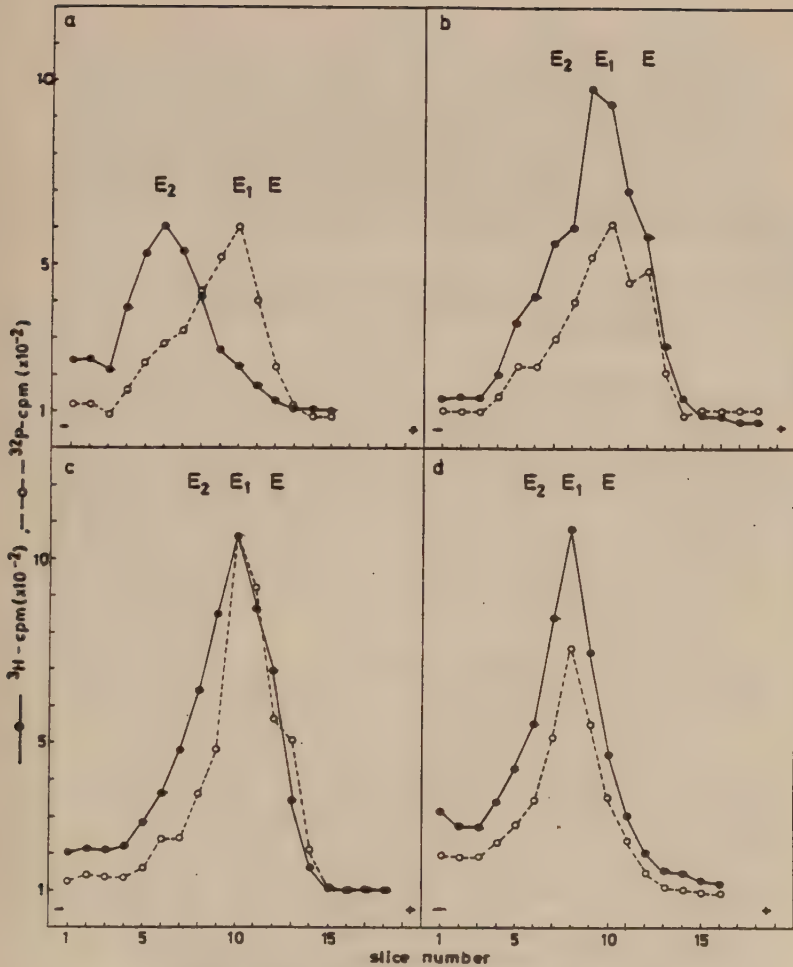


Abb. 16: Elektrophoretische Beweglichkeit des proteinhaltigen HpaI-E Fragments pulsed-chase-markierter Ad2-DNA. Ad2-infizierte HeLa-Zellen wurden 19 hpi 30 Minuten pulsmarkiert. Nach verschiedenen Chasezeiten wurden die HpaI-Restriktionsmuster der viralen DNA-Protein-Komplexe untersucht. Es ist nur der Ausschnitt aus den Gelen gezeigt, der das linke Genomende darstellt.

—●— puls-chase-markierte DNA
 - - o - - DNA-Protein-Komplex aus Virionen

a) 30 Minuten Chase, b) 2,5 Stunden Chase
 c) 3,5 Stunden Chase d) 4,5 Stunden Chase

Im Zeitraum von zwei bis vier Stunden nach der Pulsmarkierung nimmt der Anteil von E_1 dann ständig zu, bis nach etwa fünf Stunden die Restriktionsmuster der intrazellulären viralen DNA und der Virion-DNA ununterscheidbar geworden sind (s. Abb. 16).

4.2.3 Untersuchung von IN VITRO-replizierter viraler DNA

Die Untersuchung replizierender DNA-Moleküle IN VIVO wird dadurch erschwert, daß es sich bei der infizierten Zelle nicht um ein synchronisiertes System handelt. Das wirkt sich besonders bei Untersuchungen der Initiation der DNA-Replikation aus, da sie IN VIVO stets neben der Elongation bereits vor Markierungsbeginn initiiert Tochterstränge abläuft.

Unter anderem um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde in den letzten Jahren an der Entwicklung von IN VITRO-Replikationssystemen gearbeitet, die nicht nur elongieren können (z.B. Frenkel, 1978, Arens und Yamashita, 1978) sondern auch zur Neuinitiation fähig sind (Challberg und Kelly, 1979, Reiter et al., 1980). Mit einem solchen System müßte sich die Frage nach Bindung eines Proteins bei der Initiation leichter beantworten lassen als IN VIVO. Zu diesem Zweck wurden gemeinsam mit T. Reiter Untersuchungen angestellt (Reiter et al., 1980). Die Dauer einer Replikationsrunde in dem verwendeten IN VITRO-Replikationssystem beträgt 60 Minuten (Reiter, 1980) verglichen mit 17 Minuten IN VIVO (Bodnar und Pearson, 1980). Um DNA möglichst kurz nach der Initiation zu untersuchen, wurde DNA während 10 Minuten IN VITRO-Replikation mit 3H -Thymin-

triphosphat markiert (s. 3.10.3), DNA-Protein-Komplex isoliert wie beschrieben und zusammen mit ^{32}P -markiertem DNA-Protein-Komplex aus Viruspartikeln mit der Endonuklease HpaI verdaut. Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigt Abbildung 17.

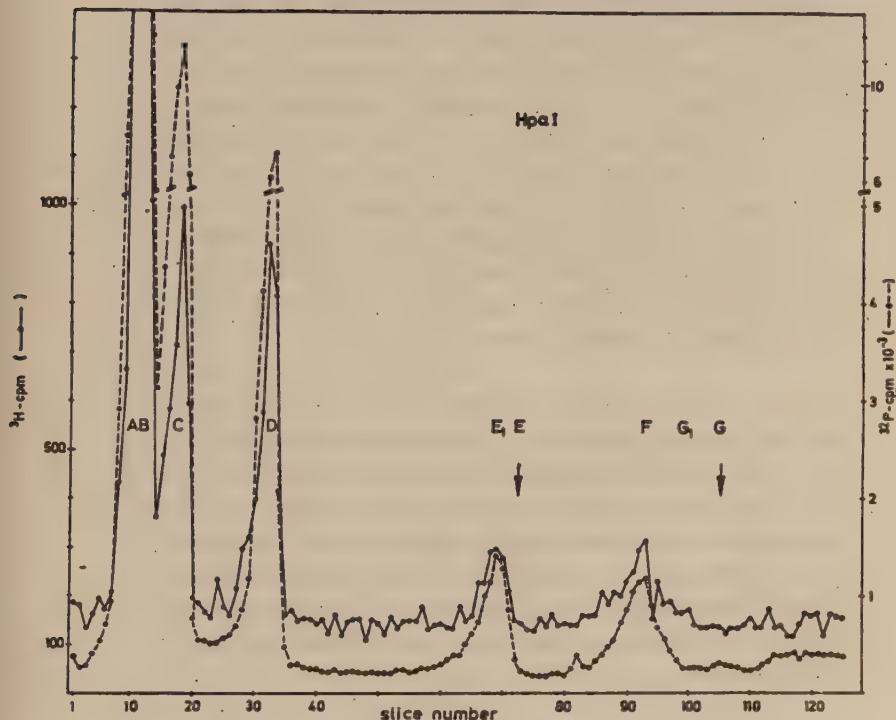


Abb. 17: Fragmentierungsmuster von IN VITRO synthetisierter Ad2-DNA.
IN VITRO-DNA-Replikation wurde für 10 Minuten unter Standardbedingungen durchgeführt (s. 3.10.3). DNA-Protein-Komplex wurde isoliert, mit HpaI fragmentiert (s. 3.6) und gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.8).
—●— IN VITRO synthetisierte DNA
—○— DNA-Protein-Komplex aus Virionen

Beide Endfragmente der IN VITRO replizierten DNA enthalten Protein. Die proteinbedingte Reduktion der Beweglichkeit der Endfragmente scheint zumindest für einen Teil größer zu sein als für die Vergleichs-DNA aus Viruspartikeln. Eine genaue Analyse ist aber auch mit dieser Methode nicht möglich, da ein Teil des gefundenen Thymidineinbaus auf Reparatursynthese zurückzuführen ist (Reiter et al., 1980). Dadurch werden auch nicht-replizierende Elternstränge markiert, wobei Endfragmente mit virioncharakteristischer Reduktion der Mobilität entstehen. Diese werden mit Fragmenten mit einer etwas mehr reduzierten Beweglichkeit vermischt, die durch Neuintiation entstanden sind.

In den geschilderten Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß replizierende Adenovirus-DNA sowohl bei IN VIVO- als auch bei IN VITRO-Replikation auch zum frühesten untersuchten Zeitpunkt bereits ein Protein am DNA-Ende gebunden hat. Dieses Protein führt zu einer größeren Verringerung der gelelektrophoretischen Beweglichkeit der terminalen DNA-Fragmente als das 55K-Protein, das im Viruspartikel an die DNA gebunden ist.

4.3 Vergleich der terminalen Proteine an replizierender und reifer viraler DNA

Die unter 4.2 geschilderten Ergebnisse lassen vermuten, daß an replikativer DNA ein Protein gebunden ist, das sich vom viralen 55K-Protein unterscheidet. Um dieses Protein näher zu charakterisieren, wurde 20 Stunden nach der Infektion DNA-Protein-Komplex aus Ad2-infizierten Zellen iso-

liert und über zwei Gleichgewichtszentrifugationen im CsCl-GuHCl-Gradienten gereinigt. Zum Teil wurde noch ein Gelfiltrationsschritt mit einer Sephadex-CL4B-Säule angeschlossen (s. 3.3.2). Der so gewonnene Komplex wurde zum Teil intakt, zum Teil nach Ultraschallbehandlung zur IN VITRO-Markierung mit ^{125}J -Bolton-Hunter-Reagens umgesetzt (s. 3.12.1) (Bolton und Hunter, 1973). Dieses Verfahren wurde notwendig, da eine IN VIVO-Markierung weder mit ^{35}S -Methionin noch mit ^{35}S -Cystein oder ^{32}P -Phosphat zu verwertbarem Radioaktivitätseinbau führte. Die Abtrennung des markierten Proteins von freier Radioaktivität erwies sich als sehr schwierig. Weder durch ausgiebige Dialysen noch durch Säulenchromatographie ließ sich eine vollständige Abtrennung erreichen (s. 3.12.2).

Nach DNaseI-Verdauung wurde das Protein mit einem analog markierten 55K-Protein aus Viruspartikeln in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verglichen. Die Molekulargewichte der auftretenden Banden durch Vergleich mit dem Coomassie-Blau-angefärbten Proteinmuster von Adenovirus Typ2 oder ^{125}J -markierten Ad2-Strukturproteinen ermittelt.

Abbildung 18 zeigt, daß auf diese Weise neben einer Proteinbande bei 55000 Dalton eine weitere bei etwa 82000 Dalton erhalten wird (s. auch Abb. 33). Die Bande bei 100K ist auf Hexonprotein zurückzuführen, das mit der DNA assoziiert ist und im Reinigungsgang nicht völlig abgetrennt werden konnte.

Dieses 82K-Protein dürfte für die unter 4.2 geschilderten Verschiebungen der terminalen Fragmente intrazellulärer viraler DNA-Protein-Komplexe gegenüber denen aus Virion-DNA-Protein-Komplexen verantwortlich sein.

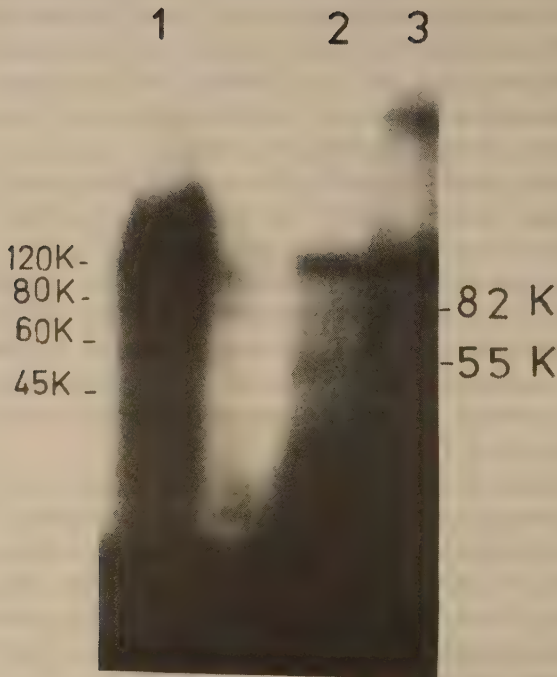


Abb. 18: Vergleich der Ad2-DNA-gebundenen terminalen Proteine aus Virionen und infizierten Zellen. Ad2-DNA-Protein-Komplexe wurden aus Virionen und Ad2-infizierten HeLa-Zellen isoliert (s. 3.3.2, 3.4) mit ^{125}J markiert (s. 3.12) und nach DNaseI-Verdauung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (12,5 % Acrylamid) untersucht (s. 3.11). Es wurden etwa 5ng Protein aufgetragen.

- 1) ^{125}J -markierte Ad2-Strukturproteine
- 2) terminales Protein aus Virionen
- 3) terminales Protein aus infizierten Zellen

Wie das 55K-Protein erwies sich auch das 82K-Protein - besonders in freier Form - als ungemein "klebrig", was sich bei allen Isolierungs- und Reinigungsversuchen sehr nachteilig bemerkbar machte. Diese "Klebrigkeit" könnte eventuell auch zu Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Teil des Bolton-Hunter-Reagenzes führen und so die Abtrennung von nicht protein-gebundenem Reagens erschweren.

In anderen Laboratorien konnte inzwischen durch partielle Proteolyse gezeigt werden, daß dieses 82K-Protein vermutlich ein Vorläufer des 55K-Proteins ist (Challberg et al., 1980, Stillman et al., 1981).

4.4 Das terminale Protein ist viruskodiert

Die unter 4.2 geschilderten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß das terminale Protein eine Rolle bei der viralen DNA-Replikation spielt. Da viele für diesen Vorgang wichtige Proteine zellulären Ursprungs sind (s. 1.4.1) und alle bisher beschriebenen viralen Proteine vom terminalen Protein verschieden waren, könnte es sich auch hier um ein zelluläres Protein handeln. Um diese Frage zu klären, sind mehrere Wege denkbar:

1. Genetisch möglichst verschiedene Serotypen von Adenovirus werden im gleichen Wirt gezüchtet. Wenn das Protein zellkodiert ist, sollte ein Vergleich der erhaltenen terminalen Proteine durch partielle Proteolyse kein Unterschiede im Peptidmuster aufzeigen.
2. Ein Serotyp wird in unterschiedlichen Wirtszellen gezüchtet. Hier sollten bei Kodierung durch die Wirtszellen Unterschiede im Peptidmuster auftreten.

3. Virusspezifische mRNA wird IN VITRO translatiert und das gebildete Protein mit dem terminalen Protein aus Virionen verglichen. Dieser Weg war in dieser Arbeit nicht gangbar, da zu diesem Zeitpunkt die Größe des Vorläufers noch unbekannt war und der erforderliche Arbeitsaufwand die Möglichkeiten überstiegen hätte.

Es wurde deshalb der unter 2. beschriebene Weg gewählt.

4.4.1 Isolierung von Ad2-DNA-Protein-Komplexen aus infizierten HeLa-, BHK-, Mm- und TC7-Zellen

Adenovirus Typ2 kann sich nicht nur in menschlichen Zellen sondern auch in Zellen anderer Säuger lytisch vermehren. Für diese Arbeit wurden BHK21- (Hamster; Shimojo und Yamashita, 1968, Williams, 1973), Mm- (Muntiac muntiacus, Hirsch; Vardimon und Doerfler, 1980) und TC7- (Affenzellen) verwendet. Die Infektion der TC7-Zellen wurde mit Ad2ND1⁺ durchgeführt, einem Ad2-Derivat, das an einer nicht-essentiellen Stelle des Genoms einen Austausch von Ad2-Sequenzen gegen SV40-Sequenzen enthält, der diesem Hybridvirus das Wachstum auf Affenzellen ermöglicht (Lewis et al., 1969).

Um sicherzustellen, daß nur funktionelle DNA-Proteinkomplexe untersucht werden, wurden Viruspartikel aus infizierten Zellen isoliert und gereinigt wie beschrieben (s. 3.2). Aus diesen Virionen wurden DNA-Proteinkomplexe durch Gleichgewichtszentrifugation gewonnen und durch Sedimentation gereinigt (s. 3.3.2). Die DNA-Ausbeute nach allen Reinigungsschritten betrug dabei etwa 1 µg pro Falconflasche bei Mm- und BHK-Zellen und 2 - 3 µg DNA bei TC7-Zel-

len. Durch Zugabe von ^3H -Thymidin oder ^{32}P -Phosphat während der Infektion konnte nachgewiesen werden, daß die isolierte DNA tatsächlich neusynthetisiert worden war und nicht aus den zur Infektion in hoher Multiplizität (moi) verwendeten Virionen stammt. In ähnlicher Weise wurde auch replizierende virale DNA aus infizierten Mm-, BHK- und TC7-Zellen isoliert und gereinigt (s. 3.2). Dabei wurde die 2 - 5fache DNA-Menge pro Falconflasche erhalten.

4.4.2 Charakterisierung der DNA-Protein-Komplexe

^{32}P -markierter DNA-Protein-Komplex aus Virionen aus infizierten BHK-Zellen wurden nach HpaI-Verdauung mit ProteinaseK-behandelter Virion-DNA verglichen. Die Abbildung 19 zeigt, daß auch die Ad2-DNA aus BHK-Zellen ein Protein am Genomende besitzt und daß die Verschiebung der Endfragmente größenordnungsmäßig der durch das 55K-Protein hervorgerufenen entspricht.

Ein ähnliches Ergebnis ergibt der Vergleich von ^3H -markierter Ad2-DNA, die direkt aus infizierten Mm- bzw. BHK-Zellen isoliert wurde (Abb. 20a, b). Die Peaks der Endfragmente sind in beiden Fällen gegenüber den viralen DNA-Protein-Komplexen in beide Richtungen verbreitert. Das läßt auf das Vorliegen von sowohl proteinfreier DNA als auch von DNA-Protein-Komplexen in den infizierten Zellen schließen. Dabei können Komplexe mit dem 55K- und dem 82K-Protein auftreten.

(Die zusätzlichen Peaks im Restriktionsmuster der DNA aus BHK-Zellen lassen sich durch unvollständige Verdauung erklären. Es fällt auf, daß die intrazelluläre virale DNA in diesem Fall schlechter

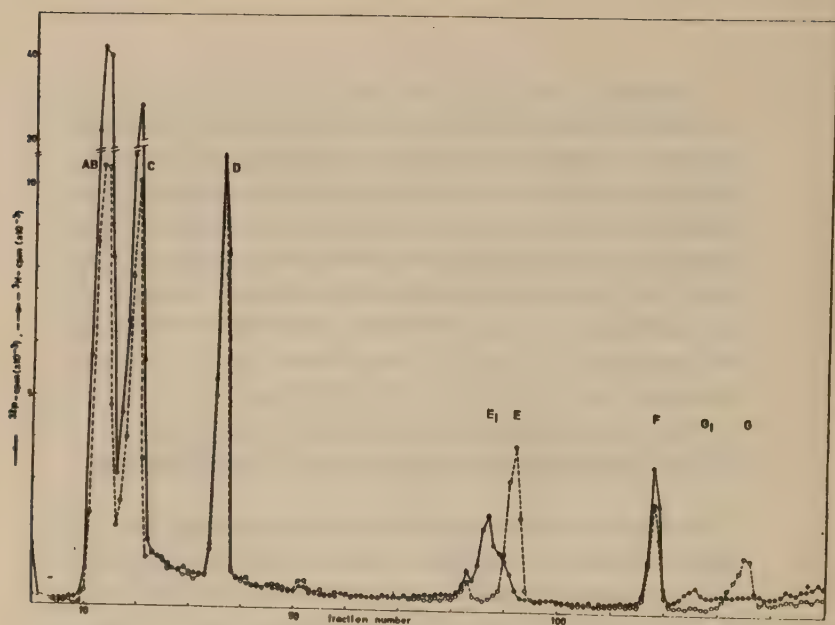


Abb. 19: Fragmentierungsmuster von Ad2-Virion-DNA aus infizierten BHK-Zellen. Ad2 DNA-Protein-Komplex von in BHK-Zellen gezüchteten Virionen wurde mit HpaI verdaut (3.6) und mit proteinfreier Ad2-DNA elektrophoretisch verglichen (s. 3.8)

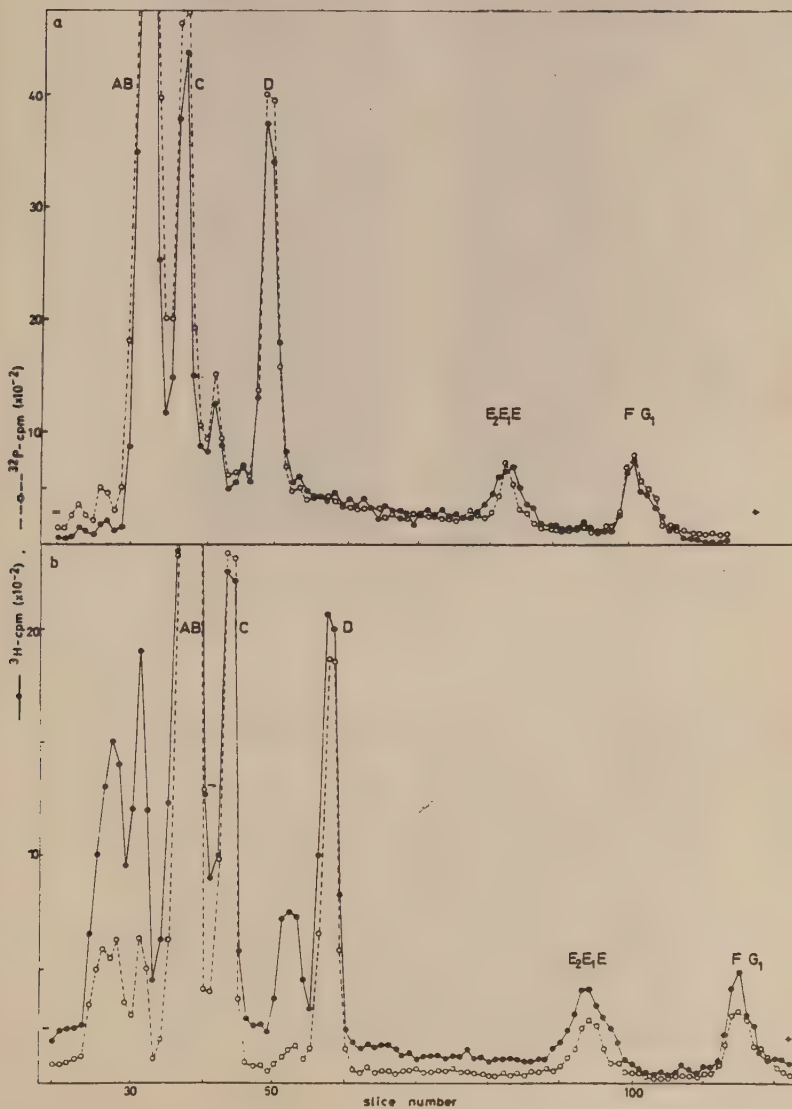
—●— DNA-Protein-Komplex (BHK)
 ---○--- proteinfreie DNA

Abb. 20: Fragmentierungsmuster intrazellulärer viraler DNA aus infizierten Mm- und BHK-Zellen. Ad2 DNA-Protein-Komplexe aus infizierten BHK- und Mm-Zellen wurden isoliert und fragmentiert (s. 3.2.3, 3.3 und 3.6) und mit Ad2 DNA-Protein-Komplexen aus Virionen elektrophoretisch verglichen (s. 3.8)

—●— DNA-Protein-Komplex aus inf. Zellen
 ---○--- DNA-Protein-Komplex aus Virionen

a) Komplexe aus infizierten BHK-Zellen
 b) Komplexe aus infizierten Mm-Zellen

gespalten wird als die aus Virionen isolierte. Das ließe sich durch partielle Modifizierung der intrazellulären DNA (z.B. durch Methylierung) und selektive Verpackung der unmodifizierten DNA erklären. Diese Frage wurde jedoch nicht näher untersucht.)



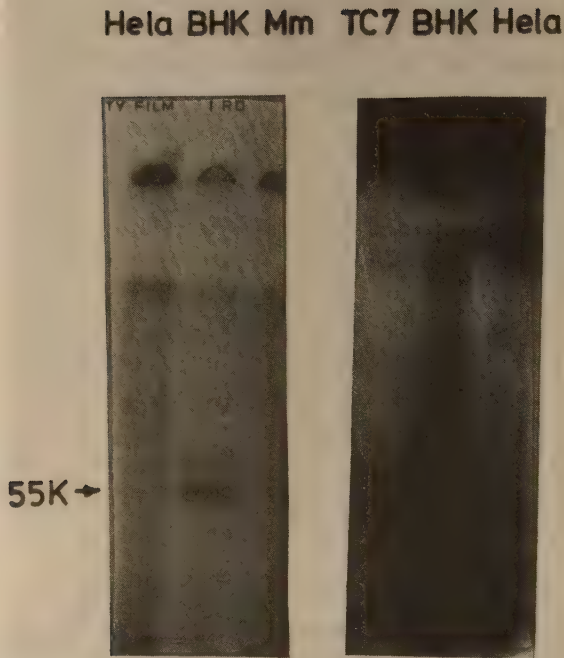


Abb. 21: Vergleich der terminalen Proteine an Ad2-DNA aus Virionen aus verschiedenen Zelllinien.

Virionen wurden aus infizierten HeLa-, BHK-, Mm- und TC7-Zellen isoliert (s. 3.2.3) und die terminalen Proteine der entsprechenden DNA-Protein-Komplexe mit Bolton-Hunter-Reagens radioaktiv markiert (s. 3.12). Nach DNaseI-Verdauung wurden etwa jeweils 1 - 3 ng Protein durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (10 % Polyacrylamid) charakterisiert (s. 3.11). Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte durch Vergleich mit Coomassie-Blau-angefärbten Ad2 Strukturproteinen.

4.4.3 Vergleich der terminalen Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gereinigten DNA-Protein-Komplexe wurden wie beschrieben mit Bolton-Hunter-Reagens jodiert (s. 3.12), und die Proteine nach DNaseI-Verdauung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese charakterisiert. In mehreren Versuchsansätzen zeigte sich, daß das terminale Protein aus Viruspartikeln in allen vier untersuchten Fällen komigriert (s. Abb. 21).

Die Jodierung von DNA-Protein-Komplexen aus infizierten Zellen führte in allen vier Fällen zur Bestimmung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 55000, 66000, 82000 und über 120000 Dalton (s. Abb. 22). Beim 55K und beim 82K-Protein sollte es sich um die bereits beschriebenen terminalen Proteine handeln. Die Bande bei 66K, die in diesem Versuch auch bei DNA aus HeLa-Zellen auftrat, könnte auf den Zusatz von Serumalbumin bei der DNaseI-Verdauung zurückzuführen sein und von spezifischer oder unspezifischer Bindung von nichtreagiertem Bolton-Hunter-Reagens an dieses BSA herrühren. (Der BSA-Zusatz erfolgte zur Stabilisierung der geringen Proteinmengen im Ansatz (z.T. weniger als 10 ng)). Die beobachteten Banden bei großen Molekulargewichten könnten durch Komplexbildung oder unvollständige DNaseI-Verdauung entstanden sein.

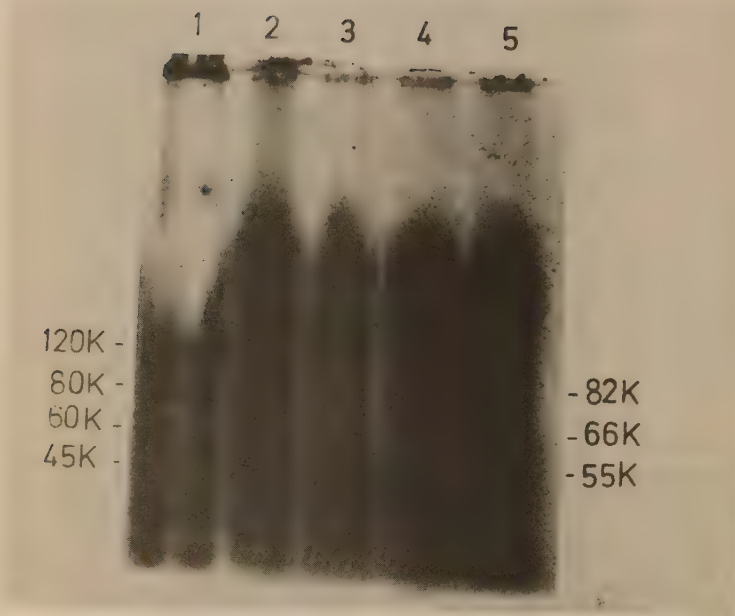


Abb. 22: Vergleich der terminalen Proteine an intrazellulärer viraler DNA aus verschiedenen Zelllinien.
 DNA-Protein-Komplexe aus HeLa-, BHK-, Mm- und TC7-Zellen wurden isoliert (s. 3.4), mit ^{125}J markiert (s. 3.12) und nach DNaseI-Verdauung (in Gegenwart von 5 μg BSA) durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (10 % Polyacrylamid) charakterisiert (s. 3.11). Es wurden etwa 2 - 10 ng terminales Protein aufgetragen.

Bahn 1: ^{125}J -markierte Ad2 Strukturproteine
 Bahn 2: terminale Proteine aus HeLa-Zellen
 Bahn 3: terminale Proteine aus BHK-Zellen
 Bahn 4: terminale Proteine aus Mm-Zellen
 Bahn 5: terminale Proteine aus TC7-Zellen

4.4.4 Vergleich der terminalen Proteine durch partielle Proteolyse mit V8-Protease

DNA-Protein-Komplexe aus Virionen und aus infizierten Zellen wurden isoliert und jodiert wie beschrieben (s. 3.2 und 3.12) und nach partieller Verdauung mit V8-Protease gelelektrophoretisch untersucht (s. 3.13 und 3.11) (Cleveland et al., 1977 und 1978). Abbildung 23a zeigt das Peptidmuster der Virionkomplexe, Abbildung 23b das der Komplexe aus infizierten Zellen. In beiden Fällen sind die jeweiligen Muster sehr ähnlich. Neben gemeinsamen Peptiden treten aber von Fall zu Fall auch solche auf, die nur in Komplexen aus einer Zelllinie vorkommen: Im Peptidmuster treten in beiden Abbildungen jeweils zwei BHK-spezifische Banden auf und außerdem eine, die für den Komplex aus infizierten Mm-Zellen charakteristisch ist. Diese spezifischen Banden könnten auf unterschiedliche Modifizierung (z.B. Phosphorylierung) zurückzuführen sein.

Die große Ähnlichkeit der Peptidmuster (es konnten in beiden abgebildeten Autoradiographien jeweils 10 Banden identifiziert werden, die allen vier Proteinen gemeinsam waren) zeigt, daß die terminalen Proteine in Ad2 DNA-Protein-Komplexen aus allen vier untersuchten Wirten gleich sind. Das wäre für viruskodierte Proteine zu erwarten.

Dieser Befund wird durch Untersuchungen in anderen Laboratorien erhärtet, wobei die unter 4.4 1. und 3. beschriebenen Wege beschritten wurden (Harter et al., 1979, Green et al., 1979b und c, Rekosh, 1981, Stillman et al., 1981).

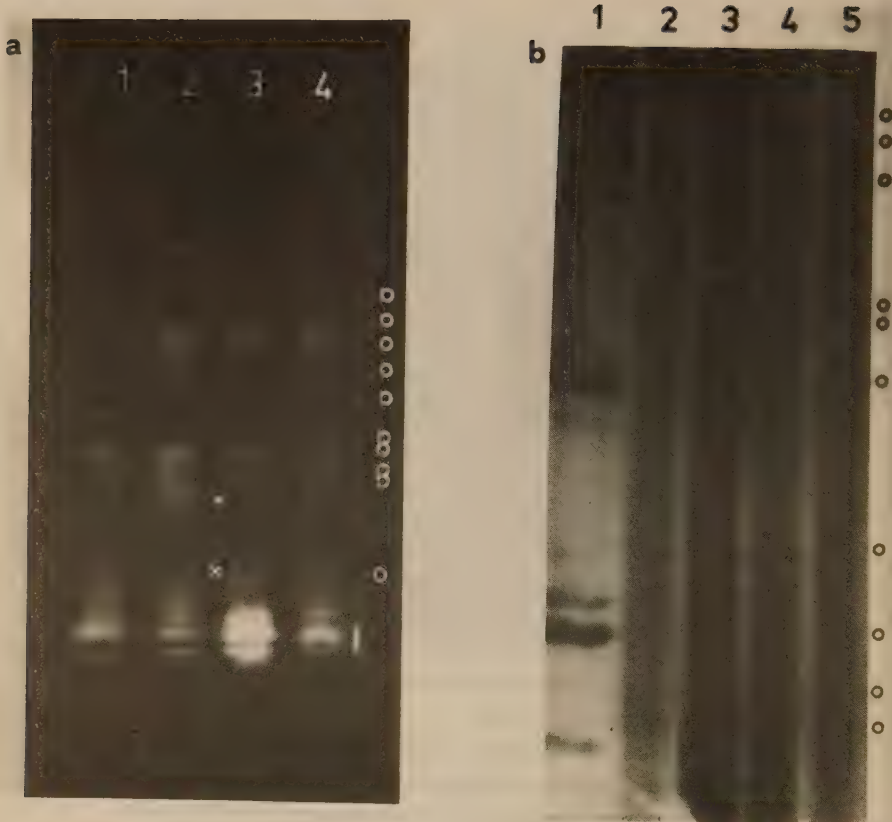


Abb. 23: Vergleich der Ad2-DNA-terminalen Proteine aus Virionen und verschiedenen infizierten Zelllinien durch partielle Proteolyse.

Die DNA-Protein-Komplexe aus 4.4.3 wurden in Gegenwart von jeweils 5 µg BSA 30 Minuten mit 20 µg V8-Protease verdaut (s. 3.13). Die Peptide wurden auf 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt (s. 3.11).

- a) Komplexe aus Virionen aus
 - 1) HeLa-, 2) BHK-, 3) Mm- und 4) TC7-Zellen
- b) Komplexe aus infizierten
 - 2) HeLa-, 3) BHK-, 4) Mm- und 5) TC7-Zellen
 - 1) ¹⁴C-markierte Ad2 Strukturproteine

Gemeinsame Peptide wurden mit o bezeichnet, für einzelne Zelllinien spezifische mit x .

4.5 Zeitliche Bestimmung des Übergangs vom 82K- zum 55K-Protein

4.5.1 Isolierung von DNA-Protein-Komplexen aus jungen Virionen

Die unter 4.2.2 geschilderten Untersuchungen der gesamten intrazellulären viralen DNA zeigen, daß die Assoziation der DNA mit dem 82K-Protein über etwa 4 Stunden stabil bleibt. In diesem Zeitraum sollte jedoch zumindest ein Teil der DNA bereits in Viruspartikel verpackt werden. Um diesen Anteil zu ermitteln, wurden Ad2-infizierte HeLa-Zellen 20 Stunden nach der Infektion mit ^3H -Thymidin für 30 Minuten pulsmarkiert, für weitere 1,5, 2,5 oder 3,5 Stunden in unmarkiertem Medium weiterinkubiert und die Viruspartikel geerntet. Zur Erleichterung des Erntevorgangs wurde den CsCl-Gradienten zum Teil etwas reifes, unmarkiertes Virus zugesetzt, so daß auf jeden Fall eine sichtbare Virusbande bei der Dichte reifer Virionen entstand.

Die DNA aus den so gewonnenen Partikeln wurde isoliert, mit HpaI verdaut und mit DNA-Fragmenten aus reifem Virus verglichen.

Zwei Stunden nach der Zugabe des radioaktiven Thymidins konnten etwa 6 % der gesamten intrazellulären viralen DNA auf diese Weise isoliert werden. (Die Gesamtmenge der intrazellulären viralen DNA wurde in einem parallel durchgeführten Versuch ermittelt, in dem virale DNA wie unter 3.4 beschrieben isoliert wurde.) Das Ergebnis ist in Abbildung 24a gezeigt: Am terminalen E-Fragment ist deutlich zu erkennen, daß zumindest ein beträchtlicher Teil der DNA mit dem 82K-Protein assoziiert ist. Die

Form des Peaks läßt sich als Summe aus einem E_1 - und einem E_2 -Peak erklären, wobei etwa 75 % der Radioaktivität auf E_2 entfällt (s. Abb. 24b). Die Radioaktivität, die am kathodischen Ende des Gels bei der Untersuchung von DNA aus jungen Virionen auftritt, macht eine Analyse der Proteinassoziation für das rechte Ende des Adenovirusgenoms unmöglich. Es könnte sich dabei um kurze DNA-Stücke handeln, die schon früher in Verbindung mit Virusreifungszwischenstufen beschrieben wurden und bei der Ultraschallbehandlung von Verpackungsintermediaten während der Isolierung entstehen (D'Halluin et al., 1978a).

Abb. 24: Charakterisierung von DNA-Protein-Komplexen aus Virionen, die 2 h nach Beginn der DNA-Markierung isoliert wurden.

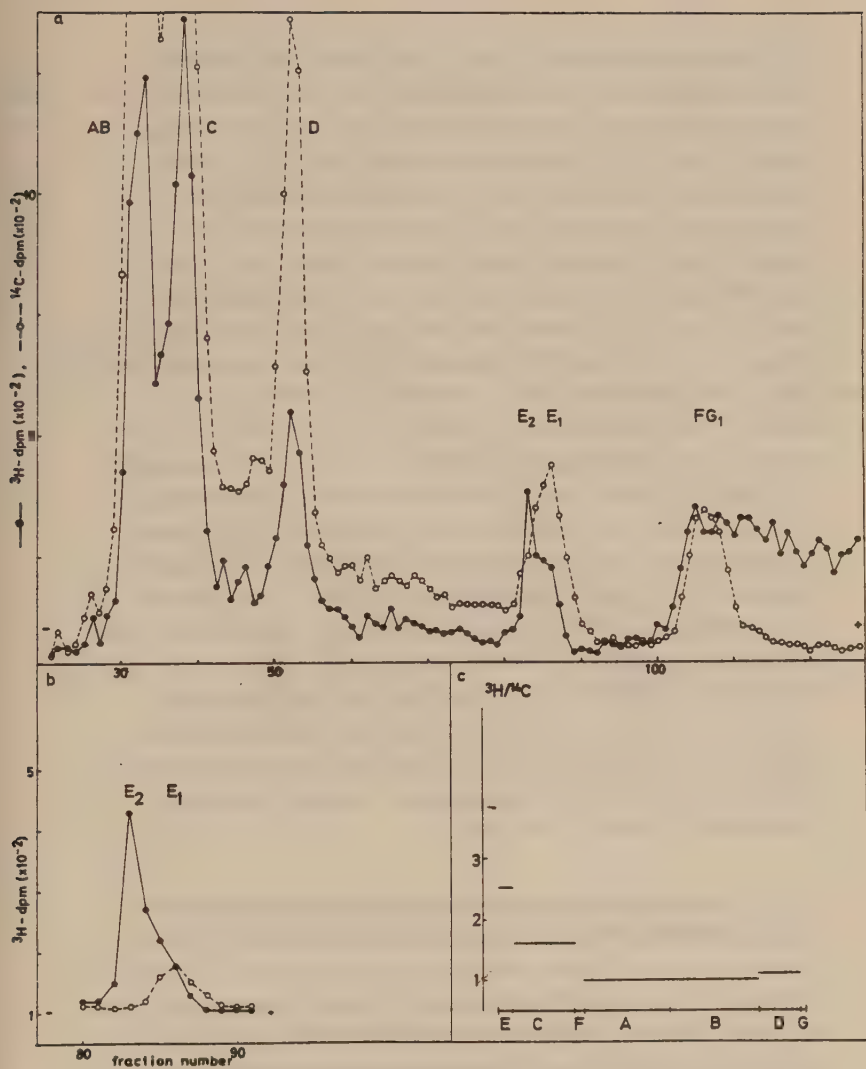
20 hpi wurden Ad2 infizierte HeLa-Zellen mit 3H -Thymidin 30 Minuten pulsmarkiert. Nach 1,5 Stunden Chase wurden Virionen durch CsCl-Gradienten-Gleichgewichtszentrifugation isoliert (s. 3.2.1). Die DNA-Protein-Komplexe aus diesen Virionen wurden nach HpaI-Verdauung mit solchen aus reifen Virionen verglichen (s. 3.8).

a) Fragmentierungsmuster der DNA-Protein-Komplexe.

—●— Komplexe aus 2 h nach Beginn der DNA-Markierung geernteten Virionen
 ---○--- Komplexe aus 38 h markierten Virionen

b) Beispiel für eine eventuelle Aufgliederung des E-Peaks aus a) in einen E_2 - (—●—) und einen E_1 -Anteil (---○---).

c) Radioaktivitätsverteilung im Genom der puls-chase-markierten Virionen. Es ist die cpm-Summe pro % der Genomlänge für die einzelnen Restriktionsfragmente dargestellt, wobei der Wert für AB = 1 gesetzt wurde.



Das Restriktionsmuster zeigt eine deutlich asymmetrische Radioaktivitätsverteilung in der puls-chase-markierten DNA. Das linke Ende des Genoms (Fragmente E und C) ist stärker markiert als das rechte (Fragment D) (s. Abb. 24c). Auch diese Asymmetrie dürfte ihren Grund in der Ultraschallbehandlung während der Virusisolierung haben. Dabei wird das aus dem Kapsid heraushängende rechte DNA-Ende eher zerstört als das linke, mit dem die DNA-Verpackung beginnt (Daniell, 1976, Hammarskjöld und Winberg, 1980). Bei längeren Chase-Zeiten trat diese Asymmetrie nicht mehr auf.

Nach 2,5 Stunden Chase konnten etwa 15 % der markierten DNA auf diese Weise isoliert werden. Abbildung 25 zeigt, daß der Anteil von E₂ auf etwa 40 % gesunken ist. Nach 3,5 Stunden Chase wurden 60 % der markierten DNA in der Virusbande gefunden. Das Restriktionsmuster war nicht mehr von dem von DNA aus reifen Viruspartikeln zu unterscheiden (s. Abb. 25). Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß reife, salzstabile Viruspartikel eine DNA enthalten, die zum Teil noch mit dem 82K-Vorläufer-Protein assoziiert ist, der erst während der Virusreifung zum 55K-Protein prozessiert wird.

4.5.2 Isolierung und Charakterisierung junger Viren (Edvardsson et al., 1976)

Dieser Versuch sollte zeigen, ob das Prozessieren des 82K-Proteins zum 55K-Protein während eines bestimmten Stadiums der Virusreifung stattfindet. Dazu sollten die Virusvorläufer, die das 82K-Protein enthalten, anhand ihrer physikalischen Eigenschaften und ihres Proteinmusters in die bestehenden Vorstellungen über den Verlauf der Virusreifung eingeordnet werden.

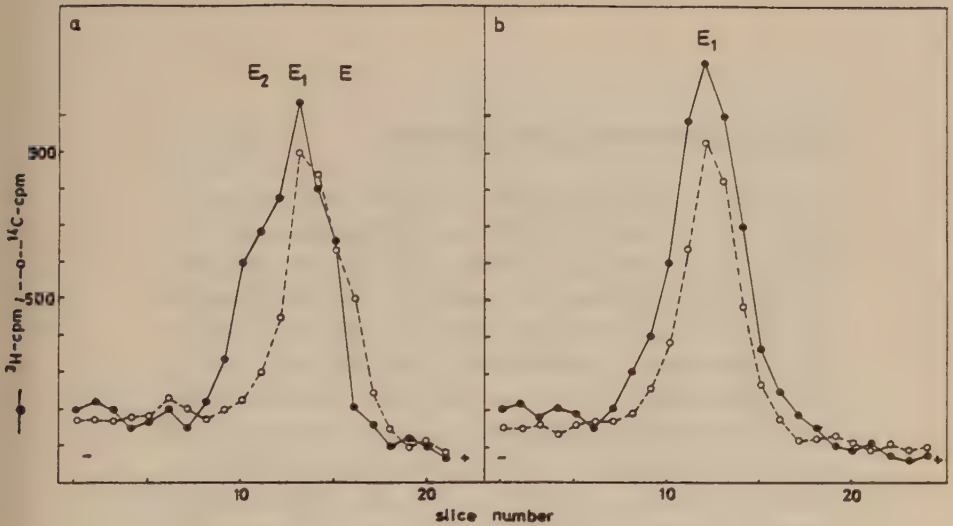


Abb. 25: Charakterisierung des linken Genomendes von puls-chase-markierten Virionen.

Virionen wurden wie für Abb. 24 beschrieben markiert und nach 2,5 h (a) bzw. 3,5 h (b) Chase isoliert. Vom HpaI-Restriktionsmuster der DNA-Protein-Komplexe ist nur der Bereich gezeigt, der das linke Genomende darstellt.

—●— puls-chase-markierte Komplexe
 - - - ○ - - - Komplexe aus 38 h markierten Virionen

Zur Isolierung der Reifungszwischenstufen wurde ein von Edvardsson et al. beschriebenes Verfahren angewendet (Edvardsson et al., 1976 und 1978, D'Halluin et al., 1978a und b). Bei diesem Verfahren werden infizierte Zellen wie beschrieben (s. 3.14.1) in Kerne und Cytoplasma getrennt und die Kerne durch Ammoniumsulfat (300 mM) extrahiert. Die Auftrennung der Extrakte erfolgte auf 25 - 40 %igen Sucrosegradienten. Die Bezeichnung für die einzelnen Peaks wurde aus der Literatur übernommen (Edvardsson et al., 1978).

4.5.2.1 Isolierung junger Virionen

Im Versuch, dessen Ergebnis in Abbildung 26a dargestellt ist, wurde 20 hpi mit ^3H -Thymidin und ^{35}S -Methionin für 30 Minuten markiert und dann für 1,5 bzw. 3,5 Stunden mit unmarkiertem Medium weiter inkubiert. Nach 2 Stunden sind die sogenannten jungen Virionen der Kernfraktion (NV-Partikel) noch sehr schwach markiert, während leere Intermediate der Virusreifung (IM-Partikel) schon deutlich nachweisbar sind. Nach 4 Stunden sind auch die jungen Virionen sowohl im Protein- als auch im DNA-Anteil deutlich markiert. Die Menge der leeren Intermediate ist in etwa gleich geblieben.

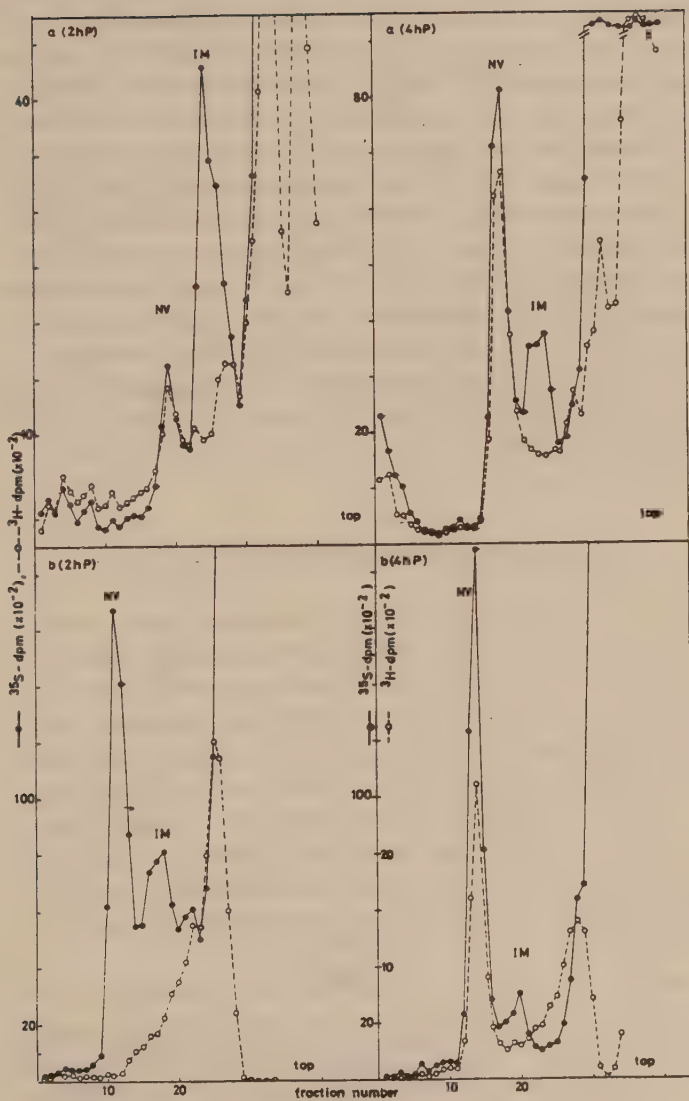
Der Abschnitt b der Abbildung 26 zeigt Ergebnisse, die nach ^{35}S -Markierung ab 15 hpi und ^3H -Pulsmarkierung für 2 bzw. 4 Stunden ab 20 hpi erhalten wurden. Auch hier ist 2 Stunden nach Beginn der DNA-Markierung noch sehr wenig DNA mit den jungen Virionen assoziiert, während sie nach 4 Stunden deutlich nachweisbar ist.

In den Cytoplasmafraktionen ließen sich in beiden Versuchen keine stabilen Partikel nachweisen. Wurde von 10 bis 24 hpi mit ^3H und ^{35}S markiert, konnte

Abb. 26: Isolierung junger Virionen.

a) 20 hpi wurden Ad2-infizierte HeLa-Zellen für 30 Minuten mit ^3H -Thymidin und ^{35}S -Methionin pulsmarkiert und nach 1,5 h bzw. 3,5 h Chase ein Kernextrakt gewonnen, der durch Sedimentation in 25 - 40 % Sucrose-Gradienten aufgetrennt wurde (s. 3.14.1).

b) wie a), aber ^{35}S -Markierung ab 15 hpi und ^3H -Markierung ab 20 hpi für 2 bzw. 4 Stunden.



neben markierten Partikeln aus der Kernfraktion auch eine kleine Radioaktivitätsmenge in sogenanntem cytoplasmatischem Virus (CV-Partikel) gefunden werden. Das Isolierungsverfahren führte zu von der Literatur abweichenden Ergebnissen, nach denen bei diesem Verfahren reife Viruspartikel in der CV-Fraktion erhalten werden. In einem Kontrollversuch konnte von einer großen Menge extern zugesetztem reifem Virus nur etwa 30 % intakt in der Cytoplasmafraktion wiedergefunden werden. Der Rest wurde unter den angewendeten Bedingungen entweder zersetzt oder ging in den nichtverarbeiteten Zentrifugationsrückständen verloren. Bei einem ungünstigeren Verhältnis von reifen Viruspartikeln zu infizierten Zellen könnte dieser Bruchteil der isolierbaren Virionen noch kleiner sein.

4.5.2.2 Dichtebestimmung von jungen Virionen

Aliquots der einzelnen Peakfraktionen wurden nach Dialyse ohne weitere Vorbehandlung in CsCl-Gradienten in das Gleichgewicht zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen bilden sowohl die Partikel aus der Cytoplasmafraktion als auch die jungen Virionen aus der Kernfraktion einen Hauptpeak bei einer Dichte von $1,358 \text{ g/cm}^3$. Bei dieser Dichte bandet auch reifes Virus (s. Abb. 27). Die IM-Fraktion wird in mehrere Peaks aufgespalten, was auf Inhomogenität beziehungsweise Instabilität der Partikel hindeutet.

Während die jungen Virionen aus der Kernfraktion völlig stabil sind (außer dem Hauptpeak treten keine anderen auf, die auf Zerfallsprodukte schließen lassen könnten) scheinen die Partikel aus dem Cytoplasma instabil zu sein.

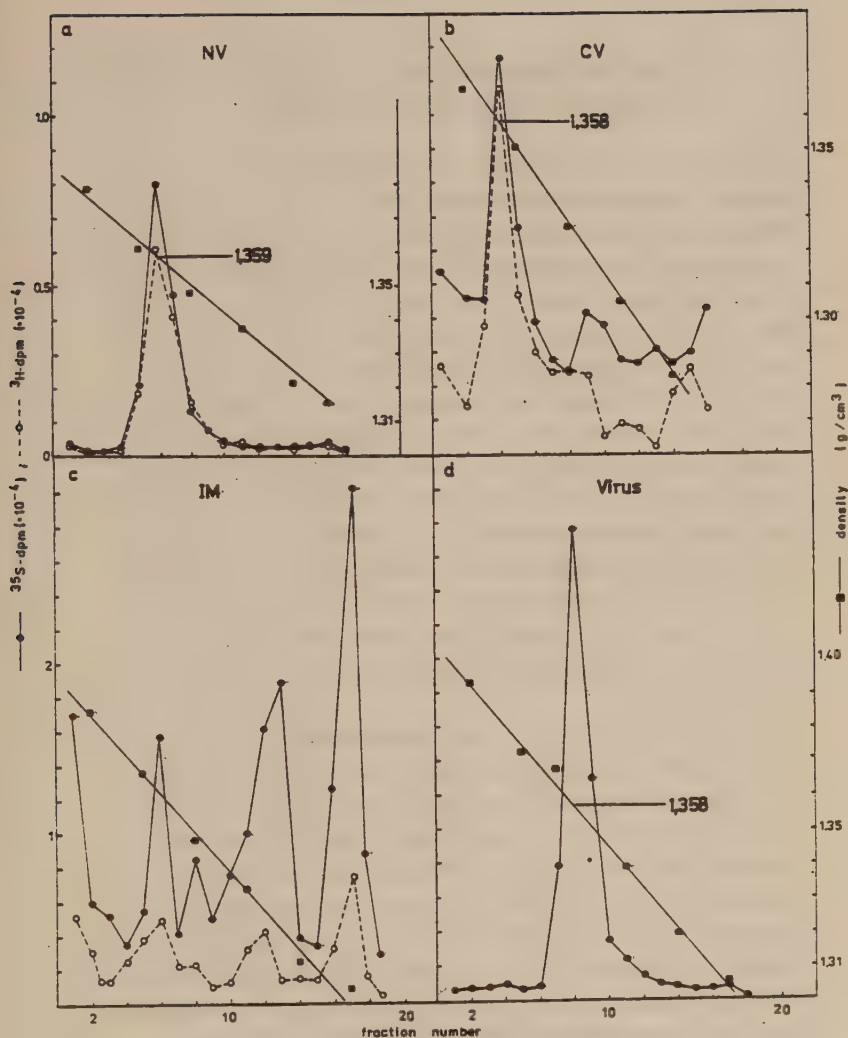


Abb. 27: Dichtebestimmung von jungen Virionen.

Sucrose-Gradienten-Fractionen (s. Abb. 26) wurden in CsCl-Gradienten ins Gleichgewicht zentrifugiert. Die Dichtebestimmung der einzelnen Fractionen erfolgte durch Messung des Brechungsindex bei 20°C.

- a) NV-Partikel, b) CV-Partikel,
c) IM-Partikel, d) reife Viruspartikel

4.5.2.3 Charakterisierung der DNA aus jungen Virionen aus der Kernfraktion (NV-Partikel)

Aus den auf verschiedene Weise markierten Partikeln wurden DNA-Protein-Komplexe isoliert und ihr HpaI-Fragmentierungsmuster mit dem von DNA-Protein-Komplexen aus reifen Viruspartikeln verglichen. Abbildung 28a und b zeigt, daß beide Endfragmente aus NV-Partikeln gegen die aus reifen Virionen verschoben sind. Abbildung 28a zeigt dieses Ergebnis für DNA aus pulsmarkierten jungen Virionen (s. Abb. 26a), Abbildung 28b für DNA aus langzeitmarkierten. Die beobachtete Verschiebung ist allerdings nicht so groß, wie sie für das reine 82K-Protein zu erwarten wäre. Es könnte also eine Mischung aus 82K- und 55K-Protein vorliegen oder eine Assoziation der DNA mit einem Zwischenprodukt der Proteinumwandlung. Eine solche Zwischenstufe mit einem Molekulargewicht von 69000 Dalton wird von Stillman et al. (1981) diskutiert.

Die DNase-Sensitivität der NV-assoziierten DNA wurde getestet, um nachzuweisen, daß diese DNA völlig in die Partikel verpackt und nicht nur locker assoziiert ist bzw. noch weitgehend aus den Partikeln heraushängt. Dazu wurden NV-Partikel während 1,5 Stunden mit 5 µg DNaseI behandelt und zu den angegebenen Zeiten die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt (s. Abb. 29). Eine zweite Probe wurde vor der Verdauung 5 Minuten auf 50 °C erhitzt, langsam abgekühlt und dann ebenso mit DNaseI behandelt. Durch dieses Verfahren sollte einerseits ein eventuell vorhandenes Kapsid aufgebrochen werden, andererseits aber die Wechselwirkung der DNA mit DNA-bindenden Proteinen möglich bleiben, da aus die-

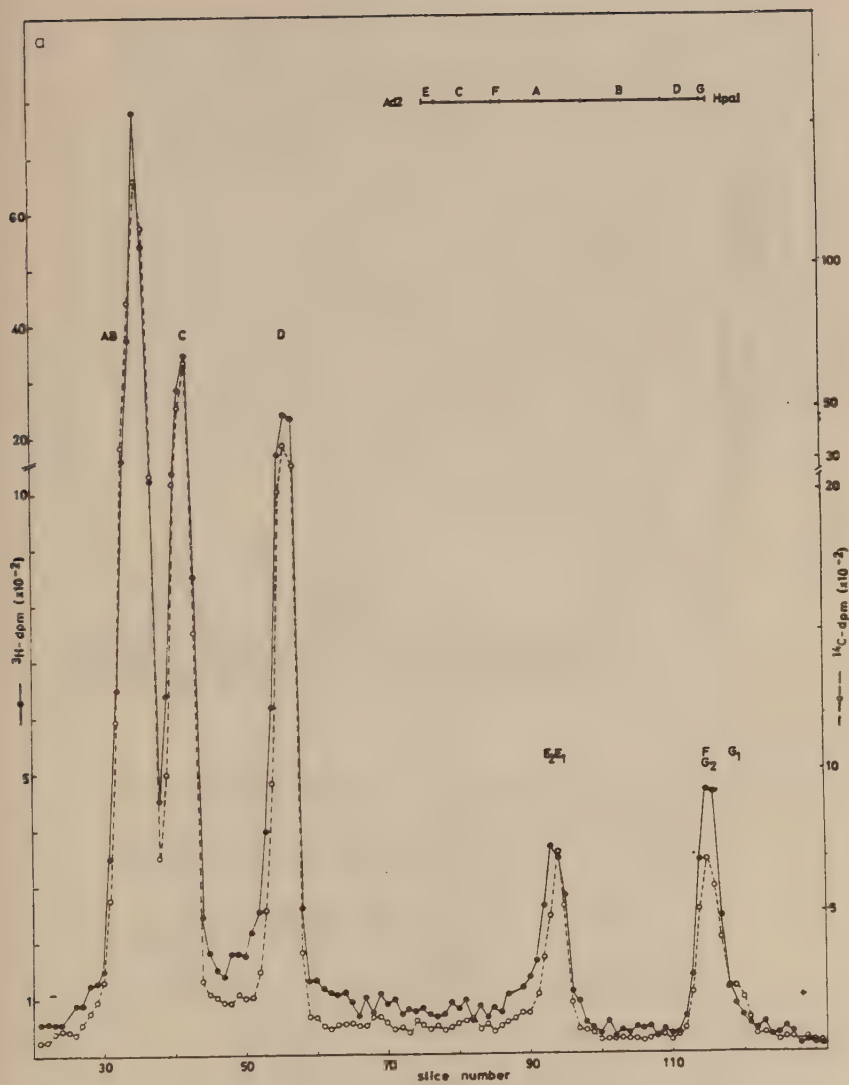


Abb. 28a: Beschreibung s. S. 96.

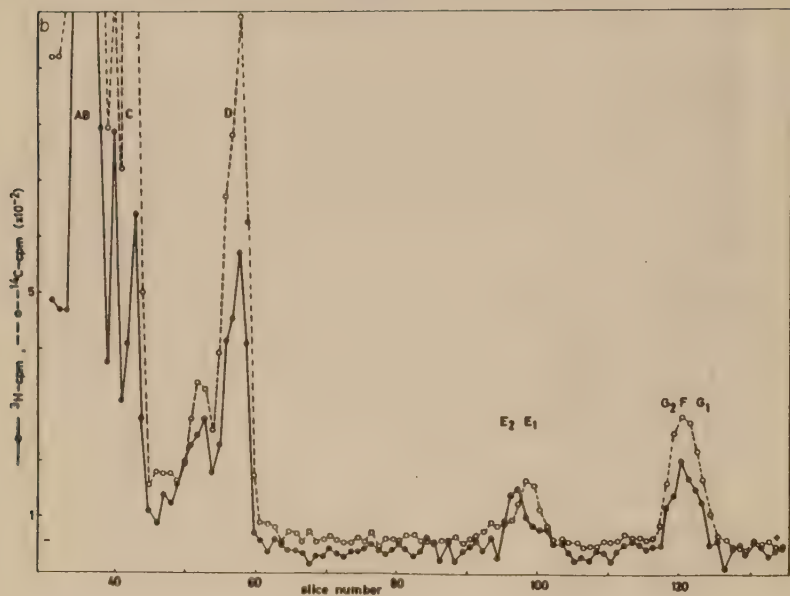


Abb. 28: Charakterisierung von DNA-Protein-Komplexen aus jungen Virionen.

DNA-Proteinkomplexe aus NV-Partikeln wurden nach HpaI-Verdauung mit solchen aus reifen Virionen verglichen.

- Komplexe aus NV-Partikeln
- Komplexe aus reifen Virionen

- a) DNA-Markierung erfolgte 20 - 24 hpi
- b) DNA-Markierung erfolgte 10 - 24 hpi

ser Wechselwirkung ebenfalls ein Schutz gegen DNase-Verdauung resultieren könnte (Nass und Frenkel, 1980). In der denaturierten Probe wurde die DNA weitgehend abgebaut, während in der nichtdenaturierten Probe die DNA bis auf einen Anteil von etwa 20 % gegen DNase geschützt war (s. Abb. 29). Das zeigt, daß sich die NV-assoziierte DNA zumindest zum größten Teil in den Kapsiden befindet und macht außerdem eine Assoziation dieser DNA mit DNA-bindenden Proteinen unwahrscheinlich, denn diese hätten die DNA vor dem DNase-Abbau geschützt (das gilt zumindest für das 72K-Protein, aber vermutlich auch für die Core-Proteine).

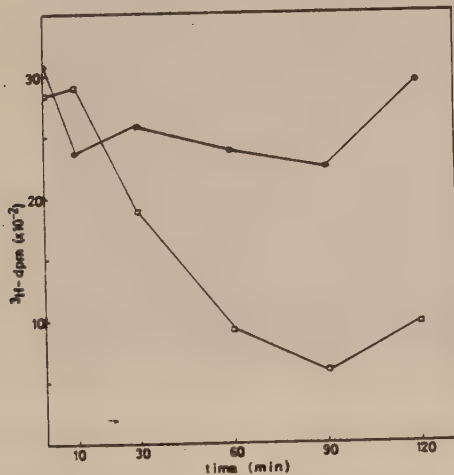


Abb. 29: DNase-Sensitivität junger Virionen.

NV-Partikel wurden mit 5 µg DNaseI inkubiert und zu den angegebenen Zeiten die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt (s. 3.14.2).

—○— Die Probe wurde vor der DNase-Behandlung 5 Minuten auf 50°C erhitzt und langsam abgekühlt

—●— unbehandelte Probe

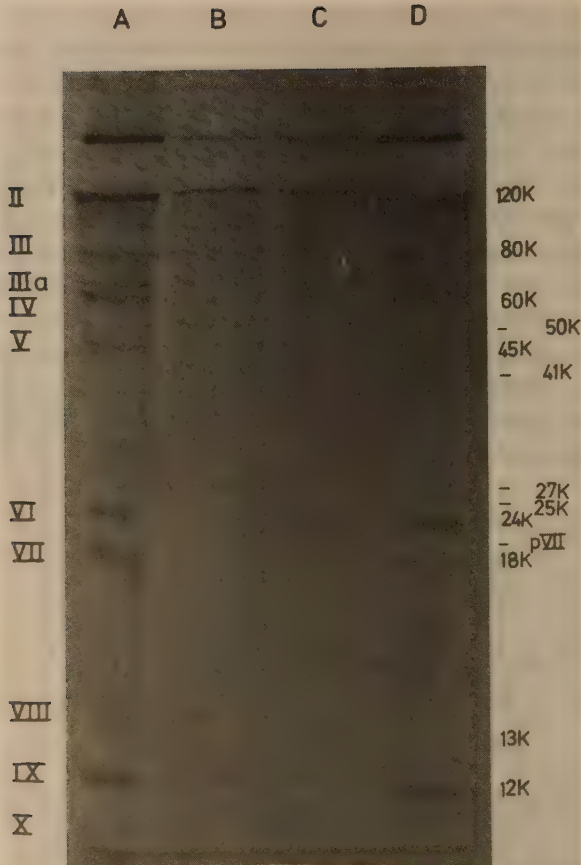


Abb. 30: Proteinmuster der Virusreifungsintermediate.

Die entsprechenden Sucrose-Gradienten-Fractionen wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht (s. 3.11).

A und D: reifes Virus (^{14}C -markiert)
B: IM-Partikel, C: NV-Partikel

Römische Zahlen bezeichnen Strukturproteine oder deren Vorläufer.

4.5.2.4 Das Proteinnmuster der Virusreifungsintermediate

Um die isolierten NV- und IM-Partikel näher zu charakterisieren, wurden ihre Proteine nach ^{35}S -Markierung in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt (s. Abb. 30). In keinem Fall wurden die Core-Proteine V und VII oder der VII-Vorläufer pVII beobachtet, während alle übrigen Strukturproteine auftreten. Zusätzlich enthalten die IM-Partikel mindestens vier weitere Proteine mit Molekulargewichten von 50K, 41K, 27K und 25K (s. Abb. 31). Zumindest das 50K- und das 25K-Protein treten auch in NV-Partikeln auf. Der Nachweis des 27K-Proteins in NV-Partikeln war in mehreren Fällen möglich, der relative Anteil dieses Proteins war jedoch immer wesentlich niedriger als in den IM-Partikeln. (Die CV-Partikel waren weitgehend mit den NV-Partikeln identisch.)

Bei diesen zusätzlich auftretenden Proteinen könnte es sich um die bereits in der Literatur beschriebenen "Reifungsproteine" 50K und 39K und die Vorläuferproteine pVI und pVIII, deren Molekulargewichte mit 26,9K und 25K angegeben wurden, handeln (z.B. D'Halluin et al., 1978, Persson et al., 1979b, Akusjärvi und Persson, 1981). Alle diese Proteine wurden bereits in Virusreifungszwischenstufen nachgewiesen.

4.5.2.5 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Virusreifungsintermediate

IM- und NV-Partikel aus den Sucrosegradienten (s. Abb. 26) wurden mit Uranylacetat fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Das Ergebnis ist in

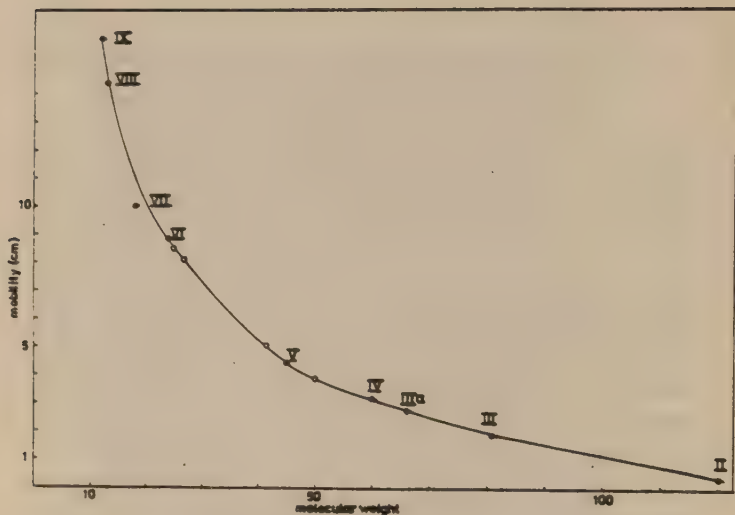


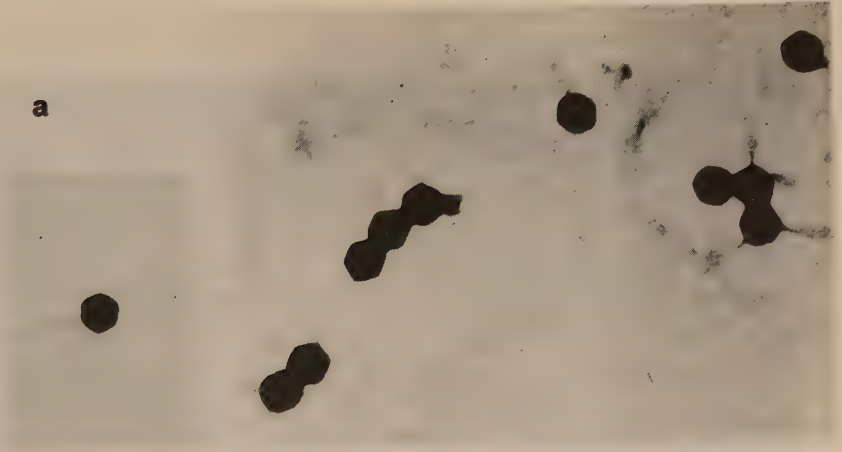
Abb. 31: Molekulargewichtsbestimmung der für Virusreifungsintermediate spezifischen Proteine.

Aufgetragen wurde die Wanderungsstrecke der Ad2 Strukturproteine im Polyacrylamid-Gel gegen das Molekulargewicht. Die in den Intermediaten zusätzlich auftretenden Proteine sind mit —●— bezeichnet.

Abbildung 32 dargestellt.

Die Partikel der IM-Fraktion nahmen alle Uranylacetat auf, besitzen also keine abgeschlossene Hülle und keine DNA. In der NV-Fraktion konnten solche Partikel ebenso nachgewiesen werden wie solche, die nicht oder nur wenig "anfärbbar" waren und darin eher reifen Virionen glichen. Die NV-Fraktion ist also inhomogen, das heißt, sie enthält wahrscheinlich Virionen in verschiedenen Reifungsstadien. In beiden Fraktionen traten neben Viruspartikeln

a



b

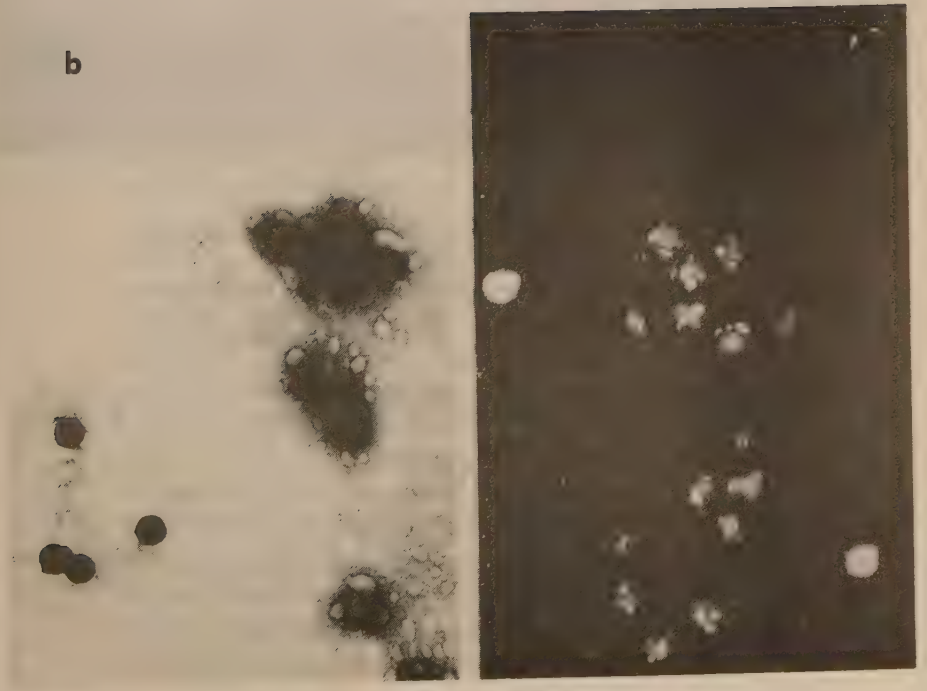


Abb. 32a, b: Beschreibung s. S. 102.



Abb. 32: Elektronenmikroskopische Untersuchung von Virusreifungsintermediaten.

IM- und NV-Partikel aus Sucrose-Gradienten-Fractionen wurde mit Uranylacetat negativ kontrastiert und im Elektronenmikroskop mit reifen Virionen verglichen.

- a) IM-Partikel, b) NV-Partikel,
- c) reife Virionen

auch unidentifizierbare Zellbestandteile auf (eventuell Teile der Kernmembran oder des Kernskeletts). Die reiferen, weniger "anfärbbaren" NV-Partikel traten dabei stets in Assoziation mit solchen Zellbestandteilen auf, während die IM-Partikel und die "leeren" NV-Partikel meist frei vorlagen.

4.6 Gewinnung eines Antiserums gegen das terminale Protein

Für die Untersuchung des terminalen Proteins wäre die Anwendbarkeit immunologischer Methoden eine große Erleichterung. Darum wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen versucht, ein Antiserum gegen das 55K-Protein zu gewinnen (W.S. Wold, pers. Mitteilung, D. Rekosh, pers. Mitteilung). Diese Versuche blieben jedoch erfolglos. Auch im Verlauf dieser Arbeit sollte in Zusammenarbeit mit Dr. R. Scheid ein Antiserum gegen dieses Protein erzeugt werden. Dazu wurden einem Meerschweinchen insgesamt etwa 4 mg DNA-Protein-Komplex (entsprechend 20 µg Protein) in drei Portionen intracutan eingespritzt und aus je 2 ml Blut 14 Tage nach der zweiten bzw. 4 Wochen nach der dritten Injektion zwei Antiseren gewonnen (s. 3.15). Mit diesen Antiseren wurden Immunpräzipitationen mit gereinigtem, jodiertem 55K- bzw. 82K-Protein-Komplex durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß diese Proteine unter allen untersuchten Bedingungen durch unspezifische Adsorption an das Fällungsmaterial (Pansorbin von Serva oder fixierter Staphylococcus aureus (s. 3.16)) gefällt wurden, so daß keine Unterschiede zwischen dem Antiserum und dem vor der Immunisierung gewonnenen Kontrollserum festgestellt werden konnten (s. Abb. 33).

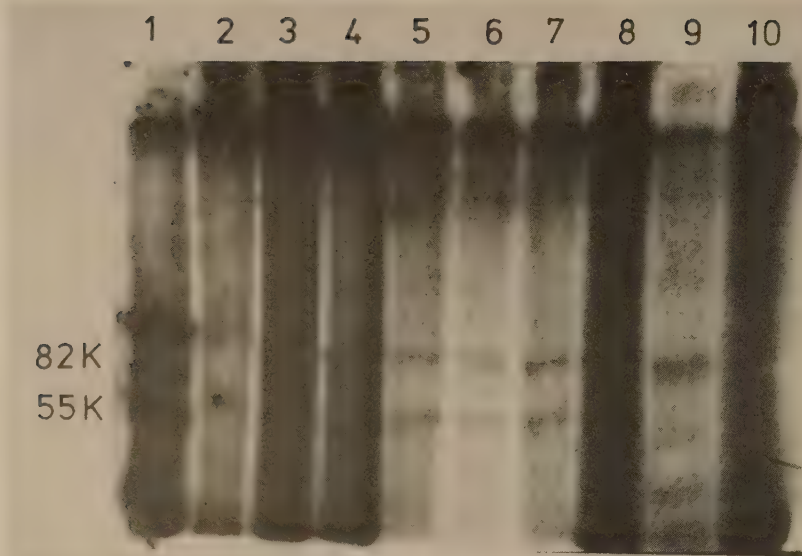


Abb. 33: Immunpräzipitationen von terminalen Proteinen aus infizierten HeLa-Zellen.

Jodierte terminale Proteine aus Ad2-infizierten HeLa-Zellen wurden mit Antiseren gegen das 55K-Protein gefällt. Zur Fällung wurde das Antiserum AS-I und das Präimmuns serum PIS (s. 3.15.2) und Pansorbin verwendet (s. 3.17). Es wurde keine Vorfällung durchgeführt.

2 - 4 : Fällung bei 4°C über Nacht

5 - 7 : Fällung bei 20°C, 1 h

2, 3, 5 und 6 : 10 µl AS-I

4 und 7 : 10 µl PIS

2, 5 und 7 : Fällung in PI-Puffer (s. 3.17)

3, 4 und 6 : Fällung in PII-Puffer (")

9 : Überstand der Fällung 3

10 : Überstand der Fällung 6

8 : Probe ohne Fällung

1 : ¹²⁵J-markierte Ad2-Strukturproteine

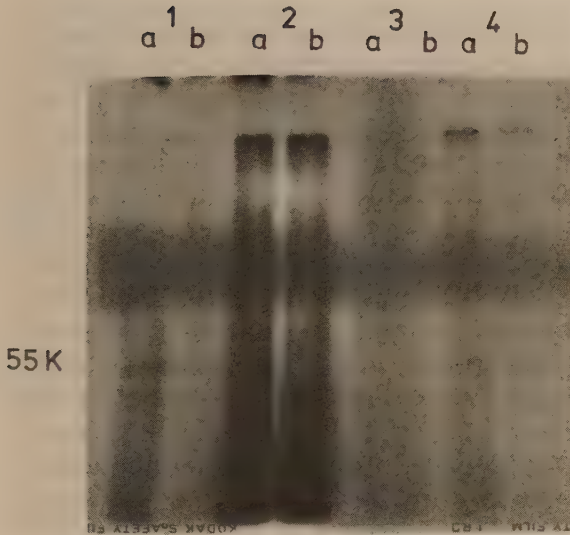


Abb. 34: Immunfällung von terminalen 55K-Proteinen aus Viruspartikeln.

Jodierte 55K-Proteine aus Viruspartikeln aus verschiedenen Zelllinien (s. 3.2.3 und 4.4.3) wurden mit dem Antiserum AS-I (s. 3.15.2) aus PII-Puffer (s. 3.17) in 1 h bei 20°C mit Pansorbin ausgefällt, nachdem eine Vorfällung mit Kälberserum durchgeführt worden war (s. 3.17).

1 : Protein aus HeLa-Zellen

2 : Protein aus BHK-Zellen

3 : Protein aus Mm-Zellen

4 : Protein aus TC7-Zellen

a : Fällung mit AS-I

b : Fällung mit Präimmunserum

Es wurde daher eine Vorfällung mit Kälberserum und Pansorbin durchgeführt (s. 3.17). Aus dem Überstand dieser Vorfällungen konnte in einigen Fällen das terminale Protein aus Viruspartikeln aus HeLa-, BHK-, Mm- und TC7-Zellen spezifisch mit Antiserum ausgefällt werden (s. Abb. 34). Bei den fallweise auftretenden kleineren Proteinen (z.B. etwa 40K bei HeLa-Zellen) könnte es sich um proteolytische Spaltprodukte des 55K-Proteins handeln. Im dargestellten Versuch konnte ein 55K-Protein aus HeLa-, BHK- und TC7-Zellen mit demselben Antiserum ausgefällt werden. (Der Nachweis in Mm-Zellen scheiterte möglicherweise an der zu geringen Menge.) Das würde wie die unter 4.4.3 und 4.4.4 beschriebenen Ergebnisse bedeuten, daß die terminalen Proteine in diesen Zelllinien mindestens sehr ähnlich sind, das heißt vermutlich viruskodiert sind.

Wegen der unspezifischen Fällung der terminalen Proteine und des augenscheinlich sehr niedrigen Titers des Antiserums erschienen die gewonnenen Seren für eingehendere Untersuchungen noch ungeeignet.

Kürzlich wurde von Green et al. (1981) ein besseres Antiserum gewonnen. Auch in diesem Fall erwies sich eine Vorklärung der Proben mit normalem Serum als günstig (Green et al., 1981).

5. Diskussion

5.1 Die Rolle des terminalen Proteins bei der Adenovirus-DNA-Replikation

Ein ungelöstes Problem bei der Replikation linearer DNA-Moleküle ist der Mechanismus der Initiation. Alle bekannten eukaryontischen DNA-Polymerasen benötigen zum Start eine freie 3'-OH-Gruppe als "Primer" (Weissbach, 1975 und 1977). In Adenovirus-DNA-Replikationskomplexen wurden bisher die zellulären DNA-Polymerasen α und γ nachgewiesen (Arens et al., 1977). Die Inhibierung der DNA-Replikation durch Aphidicolin und Dideoxythymidin weist diesen Polymerasen entscheidende Bedeutung zu (Brison et al., 1977, Frenkel, 1978, Abboud und Horwitz, 1979, Longiaru et al., 1979, van der Werf et al., 1980). In allen diesen Arbeiten konnte bisher keine virusinduzierte DNA-Polymerase nachgewiesen werden. Man kann also annehmen, daß auch für die an der Adenovirus-DNA-Replikation beteiligten Polymerasen eine Primerabhängigkeit besteht. (Kürzlich wurde von einer weiteren DNA-Polymerase bei der Adenovirus-DNA-Replikation berichtet, über deren Herkunft noch nichts bekannt ist (Enomoto et al., 1981).)

Wegen der invertierten terminalen Repetition kann die Adenovirus-DNA keine zirkulären Zwischenstufen bilden, wie sie z.B. bei λ und T7 vorkommen (Tomizawa und Ogawa, 1968, Kelly und Thomas, 1969). Eine andere Möglichkeit, wie das replizierende DNA-Molekül selbst den Primer zur Verfügung stellen kann, ergibt sich, wenn palindrome Sequenzen am Genomende vorliegen. Der Strang mit dem 3'-Ende kann sich dann durch intramolekulare Basenpaarung

zurückfalten (Cavalier-Smith, 1974, Tattersall und Ward, 1976). Diese sogenannte "hairpin"-Schleife wird dann durch eine spezifische Endonuklease (eventuell das terminale Protein) geöffnet. Es konnte gezeigt werden, daß bei Adenovirus Typ5 eine solche Schleife maximal 50 Basen lang sein könnte (Sussenbach und Kuijk, 1978b). Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Wu et al., 1977) und Sequenzanalysen (Steenbergh et al., 1977) konnten in diesem Bereich jedoch keine solchen palindromen Sequenzen lokalisieren.

Da also keiner der bekannten Mechanismen auf die Initiation der Adenovirus-DNA-Replikation angewendet werden konnte, wurde das kovalent an die 5'-Enden des Genoms gebundene Protein in die Modellvorstellungen einbezogen. Ein entsprechendes Modell wurde von Rekosh et al. (1977) vorgeschlagen. Danach sollte ein freies terminales Protein ein Deoxycytidin bzw. ein Deoxycytidintriphosphat binden, dessen 3'-OH-Gruppe nach Wechselwirkung des freien Proteins dem an den Matrixstrang gebundenen Protein als Primer für die DNA-Synthese dienen könnte (s. Abb. 5). Um diese Theorie zu untersuchen, wurde die replizierende virale DNA in den unter 4.2 beschriebenen Versuchen bezüglich ihrer Proteinassoziation charakterisiert. Unter allen Markierungsbedingungen konnte nur proteinassoziierte DNA nachgewiesen werden. Die DNA ist also anscheinend während des gesamten Replikationszyklus mit Protein verbunden, was nach dem Rekosh-Modell auch zu erwarten wäre. Allerdings läßt sich mit der angewendeten Methode der tatsächliche Initiationsschritt nicht erfassen:

1. Das IN VIVO-System ist nicht synchronisiert.

Radioaktivitätseinbau erfolgt auch bei kurzen

Markierungszeiten stets über das ganze Genom verteilt. Es werden immer neuinitiierte, elongierende und terminierte Moleküle erhalten.

2. Nur DNA-Restriktionsfragmente, die keine Replikationsgabel bzw. keinen partiell deplazierten Elternstrang enthalten, lassen sich in der Gelelektrophorese untersuchen. Bei der Anwendung der Restriktionsendonuklease HpaI heißt das, daß prinzipiell nur replizierende Moleküle untersucht werden können, bei denen bereits mindestens 1500 Basen vom linken bzw. 550 Basen vom rechten Ende des Genoms synthetisiert wurden.

3. Bei der Displacement-Synthese, wie sie bei der Adenovirus-DNA-Replikation vorliegt, besteht die Möglichkeit, daß der partiell deplazierte Elternstrang mit dem neusynthetisierten um den komplementären Matrix-Strang konkurriert. Da es sich bei der Basenpaarung um einen kooperativen Effekt handelt, ist besonders bei noch kurzen neusynthetisierten Strängen (das heißt kurz nach der Initiation) mit einer Verdrängung durch den Elternstrang zu rechnen - vor allem unter den unphysiologischen Bedingungen der DNA-Isolierung (Revet und Benichou, 1981) (s. Abb. 35)

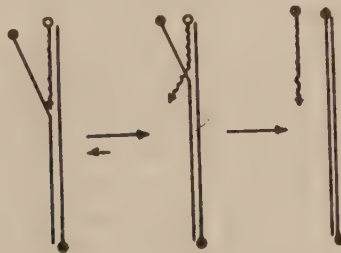


Abb. 35: Displacement-Synthese. Verdrängung des neusynthetisierten DNA-Strangs (~~~~~) durch den Elternstrang.

IN VIVO wird das unter anderem vermutlich durch Assoziation des verdrängten Elternstrangs mit dem 72K-Protein verhindert (van der Vliet und Levine, 1973).

Um zumindest die sich aus Punkt 1 ergebenden Probleme zu umgehen, wurde Ad2-DNA in einem von T.Reiter entwickelten löslichen Replikationssystem synthetisiert. Auch in diesem Fall wurde nur proteinassoziierte DNA gefunden (s. 4.2.3) (Reiter et al., 1980). In den letzten Jahren wurden auch mit anderen Methoden an replizierender DNA Proteine nachgewiesen. Dabei wurde meist die "Klebrigkeit" des DNA-Protein-Komplexes im Vergleich zu proteinfreier DNA als Nachweis der Proteinassoziation benutzt. So bindet replizierende Ad2-DNA über ein Protein an BND-Cellulose (Horwitz et al., 1979, Stillman und Bellet, 1979) bzw. an Glasfilter (Coombs et al., 1979, Robinson et al., 1979). Elektronenmikroskopisch wurde replizierende DNA in zirkulären Formen nachgewiesen, die über Proteinwechselwirkungen erzeugt wurden (Girard et al., 1977, Kelly und Lechner, 1979). Die Endfragmente replizierender DNA werden nach Restriktionsverdauung an der Oberfläche detergensfreier Agarose-Gele zurückgehalten (van Wielink et al., 1979).

Alle diese Eigenschaften teilt die replizierende DNA mit proteinassoziiierter DNA aus Viruspartikeln. Aus diesen Ergebnissen wurde deshalb geschlossen, daß die replizierende DNA mit dem gleichen Protein verbunden ist, wie die DNA aus Viruspartikeln. Das in dieser Arbeit verwendete Nachweissystem hat gegenüber den oben genannten den Vorteil, daß nicht nur ein Alles-oder-Nichts-Effekt gemessen werden

kann, sondern auch Aussagen über die Größe des assoziierten Proteins möglich sind. Es zeigt sich, daß virale intrazelluläre DNA, die mit kurzen Pulszeiten markiert wurde (z.B. 30 Minuten, s. 4.2.1), an ihrem Ende ein Protein oder Proteine trägt, die zu einer größeren Verschiebung der Gelorte dieser Fragmente gegenüber solchen mit einem 55K-Protein führt. Längere Markierungszeiten (z.B. 4 Stunden, s. 4.2.1) zeigen, daß über 90 % der so erfassten intrazellulären viralen DNA in dieser Form vorliegt. Die Größe dieses Proteins konnte durch IN VITRO-Markierung mit ^{125}J nach der Methode von Bolton und Hunter (1973) bestimmt werden. Die Markierung von 20 hpi isolierter viraler DNA führte zu einer Proteinbande bei 82000 Dalton.

Fast die gesamte Menge der intrazellulären viralen DNA liegt zum Zeitpunkt maximaler DNA-Synthese in Assoziation mit einem 82K-Protein vor. Vermutlich ist die Ad2-DNA also auch in dieser Form als Replikationsmatrix aktiv.

Nach IN VITRO-Replikation ist das 82K-Protein nicht so klar nachweisbar wie bei den IN VIVO-Versuchen. Eine Verbreiterung der Peaks der Endfragmente deutet aber darauf hin, daß zumindest ein Teil der DNA mit dem 82K-Protein assoziiert ist. Der so entstehende Peak ist von dem der 55K-Protein-assoziierten Endfragmente überlagert. Das dürfte darauf zurückzuführen sein, daß in dem verwendeten System nur etwa 20 % der eingesetzten DNA-Moleküle zum Replikationsstart befähigt waren und außer durch Replikation auch durch Reparatursynthese beträchtlicher Radioaktivitätseinbau erfolgte (Reiter, 1980).

Mit verbesserten IN VITRO-Systemen konnte inzwischen an neusynthetisierter DNA tatsächlich ein 80K-Pro-

tein nachgewiesen werden. Partielle Proteolyse ergibt für die mit dem 80K-Protein assoziierten terminalen DNA-Fragmente ein ähnliches Muster wie für die mit dem 55K-Protein assoziierten. Das 80K-Protein scheint also ein direkter Vorläufer des 55K-Proteins zu sein (Challberg et al., 1980). Beide Proteine sind durch eine Phosphodiesterbindung über die OH-Gruppe eines Serinrests an das 5'-terminale Cytidin der Adenovirus-DNA gebunden (Challberg et al., 1980, Desiderio und Kelly, 1981). Mit Hilfe einer temperatursensitiven Adenovirusmutante, die einen Defekt in einer virusinduzierten Protease hat (H2ts1, Begin und Weber, 1975, Weber, 1976), konnte von Challberg und Kelly (1981) inzwischen auch IN VIVO unter restriktiven Bedingungen ein 80K-Protein an der intrazellulären viralen DNA nachgewiesen werden. Dieser 80K-Protein-DNA-Komplex ist IN VIVO anscheinend normal replikationsaktiv und kann auch in IN VITRO-Experimenten als Matrix eingesetzt werden (Stillman et al., 1981).

Diese Ergebnisse sprechen alle für eine Beteiligung des terminalen Proteins (55K oder 82K) an der Adenovirus-DNA-Replikation. Eine Funktion bei der Initiation ist so allerdings nicht zweifelsfrei nachweisbar.

Ergebnisse, die kürzlich von Lichy et al. (1981) und Pincus et al. (1981) veröffentlicht wurden, liefern allerdings starke Hinweise auf eine direkte Beteiligung des 82K-Proteins am Initiationsvorgang: In einem IN VITRO-System wird in einer DNA-Protein-abhängigen Reaktion ein 80K- bzw. 87K-Protein mit ^{32}P dCTP markiert auch wenn die DNA-Replikation durch Verhinderung der Elongationsreaktion mit Aphidicolin

(Pincus et al., 1981) oder Dideoxynukleosidtriphosphat (Lichy et al., 1981) unterbunden wird. Bei Zusatz von ddGTP wird ein Oligonukleotid von 26 Basen Länge synthetisiert, das an das 80K-Protein gebunden ist. (In der DNA-Sequenz von Ad2 befindet sich das erste Guanosin an Position 26 (Arrand und Roberts, 1979).). IN VIVO-Untersuchungen des terminalen Proteins ließen sich am leichtesten mit temperatursensitiven Mutanten durchführen. Auf diese Weise wurden z.B. Aufschlüsse über die Rolle des terminalen Proteins an der $\phi 29$ -DNA bei der Initiation der DNA-Replikation erhalten. Der Replikationszyklus des Phagen $\phi 29$ weist zumindest auf der Ebene der replikativen Intermediate eine sehr große Ähnlichkeit zur Adenovirus-DNA-Replikation auf (Harding und Ito, 1980, Inciarte et al., 1980, Sogo et al., 1982). Das terminale Protein von $\phi 29$ wird von Gen 3 kodiert (Salas et al., 1978). Mutanten im Gen 3 des Phagen können unter restriktiven Bedingungen zwar noch DNA elongieren, aber keine Neusynthese mehr initiieren (Mellado et al., 1980). Untersuchungen mit suppressorsensitiven Gen 3-Mutanten zeigen, daß bei $\phi 29$ ein funktionales parentales terminales Protein für den Start einer Replikationsrunde ausreichend ist (Mellado et al., 1980). Das würde einen Unterschied zum Rekosh-Modell darstellen, aber diese Ergebnisse lassen sich bei aller Ähnlichkeit natürlich nicht einfach auf das Adenovirus-System übertragen.

Temperatursensitive Mutanten für das terminale Protein sind bei Adenovirus bisher nicht bekannt.

5.2 Das terminale Protein ist viruskodiert

Die Verwendung zahlreicher zellulärer Enzyme bei der Adenovirus-DNA-Replikation und das Fehlen von temperatursensitiven Mutanten mit Defekt im terminalen Protein warfen die Frage auf, ob das terminale Protein virus- oder zellkodiert ist. Die Selektion von temperatursensitiven Mutanten erschien am Ausgangspunkt der Arbeit äußerst schwierig, da völlig unklar war, wie sich ein Defekt im terminalen Protein phänotypisch auswirken würde. Es sollte sich auf jeden Fall um eine sogenannte "frühe" Mutante handeln, wenn das Protein eine Rolle bei der DNA-Replikation spielt. Tatsächlich gibt es Hinweise, daß das terminale Protein früh im Infektionszyklus synthetisiert wird (Yamashita et al., 1978). Wie aus Tabelle 2 zu ersehen ist, gibt es eine Reihe von frühen ts-Mutanten, bei denen das betroffene Genprodukt und seine Funktion unbekannt sind. Um eventuell eine Lokalisierung des Genorts des 55K-Proteins auf dem Adenovirusgenom vornehmen zu können, wurden seine tryptischen Peptide mit denen von Proteinen der frühen Regionen E1 und E2_A verglichen, wobei jedoch keinerlei Ähnlichkeit festgestellt werden konnte (Harter et al., 1979, Green et al., 1979c).

Andere Wege, die Frage nach Virus- oder Wirtsspezifität des terminalen Proteins zu untersuchen, wurden unter 4.4 geschildert. In der vorliegenden Arbeit wurden die terminalen Proteine an Adenovirus-DNA verglichen, die aus HeLa-, BHK-, Nm- und TC7-Zellen isoliert wurde. Bei Wirtsspezifität des Proteins sollte bei Wirten wie Mensch, Hamster, Hirsch und Affe ein Unterschied festgestellt werden können.

Durch Analyse der DNA-Restriktionsfragmente aus Viren aus BHK-Zellen wurde auch in diesem Fall ein DNA-Protein-Komplex nachgewiesen. Das Protein führte dabei zur gleichen Reduktion der Wanderungsgeschwindigkeit der Endfragmente im Gel wie das aus HeLa-Zellen (s. 4.4.2). Auch die virale DNA in Ad2-infizierten Mm- und BHK-Zellen konnte auf diese Weise zumindest partiell in Assoziation mit Protein nachgewiesen werden. IN VITRO-Markierung von DNA-Protein-Komplexen mit ^{125}J führte in allen vier Fällen zum Nachweis eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 55000 Dalton. In Komplexen aus infizierten Wirtszellen wurde nach Jodierung neben dem 55K-Protein in allen Fällen auch ein 80K-Protein erhalten (s. 4.4.3).

Ein besserer Vergleich der Proteine ergibt sich aus der Analyse der durch proteolytische Spaltung erhaltenen Peptide. Dazu wurden die jeweiligen DNA-Protein-Komplexe mit V8-Protease aus Staphylococcus aureus gespalten (Cleveland et al., 1977). Diese Protease spaltet Proteine am Carboxylende von Aspartat und Glutamat (Houmard und Drapeau, 1972). Die erhaltenen Peptidmuster waren in allen Fällen sehr ähnlich, lediglich bei Komplexen aus BHK- und Mm-Zellen traten ein oder zwei zusätzliche oder verschobene Banden auf (s. 4.4.4). Es handelt sich also entweder um hochkonservierte zelluläre oder aber viruskodierte Proteine. Die große Ähnlichkeit der terminalen Proteine könnte auch der unter 4.6 beschriebene Versuch mit einem Antiserum gegen den Ad2-DNA-Protein-Komplex aus HeLa-Zellen belegen. Mit diesem Antiserum konnten auch 55K-Proteine aus BHK- und TC7-Zellen ausgefällt werden (s. 4.6). Wegen der Probleme, die bei den Fällungen durch

den hydrophoben Charakter der Proteine auftraten, sind diese Ergebnisse jedoch nicht sehr aussagekräftig.

Ein anderer Weg, die Frage nach Wirts- oder Virus-spezifität dieser Proteine zu beantworten, wurde von Green et al. (1979b) und von Rekosh (1981) beschritten: Dabei wurden die terminalen Proteine verschiedener Adenovirusserotypen im selben Wirt miteinander verglichen. Von Green et al. wurden die tryptischen und chymotryptischen Peptide der terminalen Proteine von Ad12 (Gruppe A), 7 (B), 2 (C), 19 (D) und 4 (E) (s. Tabelle 1) durch zweidimensionale Gelelektrophorese untersucht. Dabei wurden sehr ähnliche Peptidmuster gefunden. Diese Ähnlichkeit ließe auf ein zelluläres oder auf hochkonservierte virale Proteine schließen. (Die DNA-Sequenzhomologie beträgt über die 5 Gruppen nur 5 - 20 % (Green et al., 1979a).).

D.Rekosh verglich die terminalen Proteine aus Ad12 (A), 3 (B) und 5 (C). Dabei traten Unterschiede im Molekulargewicht und in den durch V8-Protease erzeugten Peptiden auf. Diese Ergebnisse lassen sich durch ein viruskodiertes terminales Protein deuten, das in den verschiedenen Serotypen weitgehend konserviert aber nicht identisch ist. Einen endgültigen Beweis für diese Annahme liefern sie aber nicht. Mit dem Wissen um die Größe des Vorläufers des terminalen Proteins und der Möglichkeit, ihn nach Isolierung durch proteolytische Spaltung zu charakterisieren konnte, dieses Protein auch unter virus-spezifischen IN VITRO-Translationsprodukten gesucht werden. Dabei wurde von einer neuen frühen mRNA-Familie, die hauptsächlich zwischen Position 11,2 und 31,5 auf dem 1-Strang kodiert wird (s. Abb. 3), un-

ter anderem ein 87K-Protein erhalten, dessen tryptische Peptide denen des 55K-Proteins glichen (Stillman et al., 1981). Die zugehörige mRNA wird vom Promotor der E2A-Region her gestartet und unterliegt denselben Regulationsmechanismen wie das E2A-Produkt (72K-Protein). Diese neue sogenannte E2B-Region überdeckt auch den Bereich, in dem die frühen, DNA-negativen Mutanten H5ts36, H5ts69 und H5ts149 lokalisiert wurden (Galos et al., 1979). Die für die Mutante H5ts36 beschriebenen Eigenschaften lassen darauf schließen, daß das defekte Genprodukt in katalytischen Mengen für die DNA-Replikation benötigt wird (Williams et al., 1974, Galos et al., 1979). Es ist dann nicht wahrscheinlich, daß bei diesen Mutanten das terminale Protein defekt ist, da nach den vorliegenden Ergebnissen pro synthetisiertem neuen DNA-Strang ein Proteinmolekül verbraucht wird.

Die IN VITRO-Translation der E2B-Region liefert auch ein 75K- und ein 105K-Protein, über deren Rolle nichts bekannt ist, die aber möglicherweise das thermolabile Protein der genannten Mutanten darstellen könnten (Stillman et al., 1981).

5.3 Das terminale Protein während der Virusmorphogenese

Die in 4.2 geschilderten Puls- und Puls-Chase-Experimente haben gezeigt, daß 20 Stunden nach der Infektion der überwiegende Teil der intrazellulären viralen DNA mit dem 82K-Protein assoziiert ist. Die Umwandlung zum 55K-Protein erfolgt erst in einem Zeitraum von zwei bis fünf Stunden nach Beginn der

DNA-Markierung. Zwei Stunden nach Beginn der DNA-Markierung konnte auch erstmals markierte DNA in Virusvorläufern nachgewiesen werden (s. 4.5.1). Die DNA-Protein-Komplexe aus diesen Partikeln enthielten zumindest zum Teil noch das 82K-Protein. Die Umwandlung zum 55K-Protein scheint also erst beim Eintritt der DNA in das leere Prokapsid oder, wahrscheinlicher, auf einer späteren Stufe der Virusreifung zu erfolgen. Das konnte durch Isolierung von Zwischenstufen der Virusmorphogenese bestätigt werden (s. 4.5.2). Die terminalen Fragmente der DNA-Protein-Komplexe aus diesen Partikeln weisen in der Gelelektrophorese eine Verschiebung gegenüber denen aus reifen Viruspartikeln auf. Diese ist allerdings kleiner, als für das 82K-Protein zu erwarten wäre. Das bedeutet, daß in diesen Partikeln entweder ein Gemisch von 55K- und 82K-Protein vorliegt oder daß die DNA mit einem Zwischenprodukt der Proteinumwandlung assoziiert ist. Eine solche Zwischenstufe mit einem Molekulargewicht von 62K wird von Stillman et al. (1981) diskutiert.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der DNA-haltigen Virusvorläufer zeigt deutlich eine Inhomogenität der Präparation. Es sind sowohl leere, das heißt mit Uranylacetat "anfärbbare" Partikel wie auch gefüllte Partikel. Trotz dieser Inhomogenität ist das Proteinemuster der Partikel sehr einfach. Sie enthalten alle Strukturproteine bis auf die Core-Proteine und zusätzlich noch ein 50K-Protein und die Vorläuferproteine pVI und pVIII. Die DNA-haltigen Partikel weisen dabei dieselbe Zusammensetzung wie die DNA-freien Prokapside auf, allerdings ist das Verhältnis pVI zu VI in den Prokapsiden deutlich größer als in den DNA-haltigen. Außerdem ist in den

Prokapsiden ein 41K-Protein nachweisbar. Dieses Proteinmuster weicht von dem publizierten ab. Virusvorläufer, die genomlange DNA enthielten, salzstabil waren und eine Dichte wie reifes Virus aufwiesen, sollten nach der Literatur außerdem noch die Core-Proteine V und VII und den ungeschnittenen Vorläufer pVII enthalten (Edvardsson et al., 1978, D'Halluin et al., 1978a und b, D'Halluin et al., 1980). Partikel mit einer Proteinzusammensetzung wie in dieser Arbeit geschildert wurden von D'Halluin et al. (1978a) beim Arbeiten mit der Mutante H2ts112 bei nichtpermissiver Temperatur erhalten. Dabei wurde auch gezeigt, daß die Proteinmuster je nach Isolierungsmethode unterschiedlich sind, wobei vor allem Protein pVII zunächst mit allen Partikeln assoziiert ist, jedoch nach der Fixierung der Partikel bei weiterer Reinigung verschwindet. In der Arbeit von Persson et al. (1979) zeigt sich, daß neben pVII auch das andere Core-Protein V in allen Gradientenfraktionen auftritt und darum auch mit DNA-freien Partikeln nachweisbar sein kann.

Die Reifungsintermediate, die mit der Mutante H2ts112 isoliert wurden, enthalten neben den erwähnten Proteinen allerdings auch noch ein 39K-Protein und nur kurze DNA-Stücke, die auf die Ultraschallbehandlung bei der Isolierung zurückzuführen sein dürften (D'Halluin et al., 1978). Wegen des niedrigen DNA:Protein-Verhältnisses weisen sie nur eine Dichte von $1,31 \text{ g/cm}^3$ im CsCl-Gradienten auf und sedimentieren mit 600S. Außerdem sind sie ohne Fixierung bei grossen Ionenstärken instabil. Unter permissiven Bedingungen wurden mit dieser Mutante Partikel erhalten, die mit 750S sedimentieren und kein 39K-Protein mehr enthalten, dafür aber die Core-Proteine V, pVII und VII (D'Halluin et al., 1978a) (s. Abb. 6).

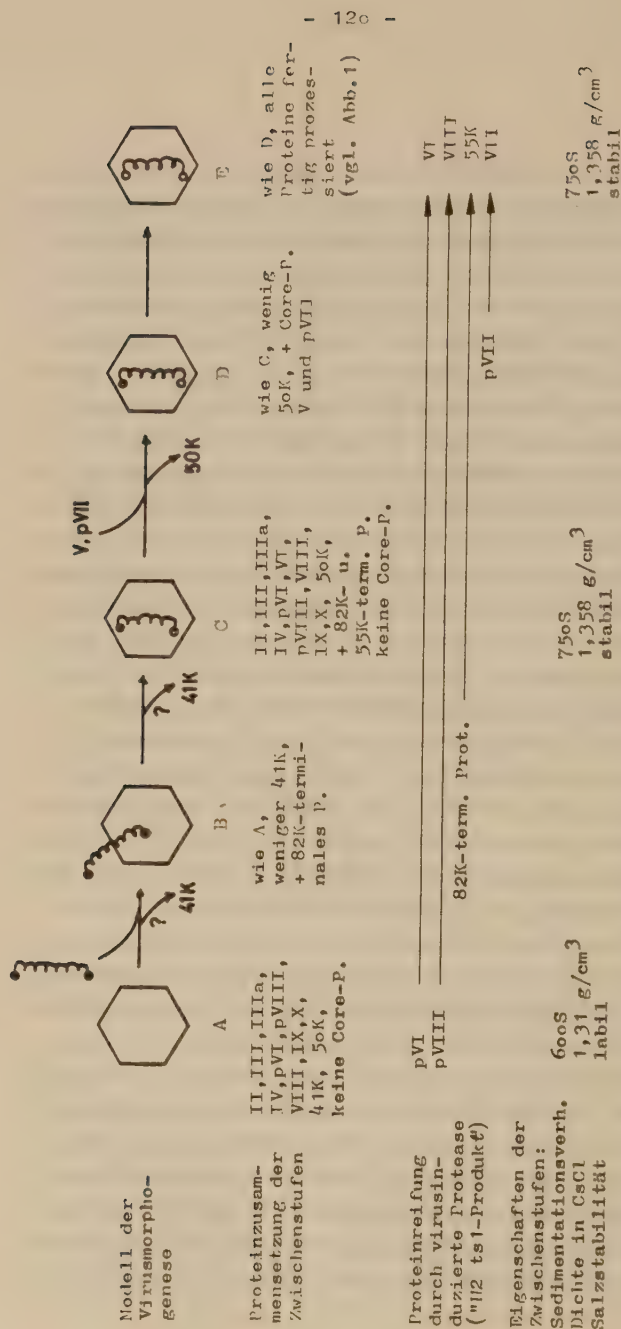


Abb. 36: Modell der Virusmorphogenese. Das Modell ist im Text beschrieben.

Die in dieser Arbeit isolierten Partikel verhalten sich wie eine Zwischenstufe zwischen den von D'Halluin et al. (1978a) beschriebenen leichten Vorläufern und jungen Virionen. Sie haben noch die Proteinzusammensetzung der leichten Vorläufer wobei allerdings das 39K-Protein bereits fehlt, enthalten jedoch genomlange DNA, sedimentieren mit 75oS und haben die Dichte reifer Virionen. Ihre Salzstabilität im Gegensatz zu den leichten Vorläufern könnte auf ihren DNA-Gehalt zurückzuführen sein. Sehr auffällig ist das Fehlen der Core-Proteine. (Es erscheint unwahrscheinlich, daß gerade die Core-Proteine während des Isolierungsvorgangs quantitativ verloren gegangen sein könnten, da sie kaum aus dem Kapsidinneren herauszulösen sein dürften, ohne daß das Kapsid selbst aufgebrochen wird. Das Protein VII läßt sich nur unter stark denaturierenden Bedingungen von der DNA abtrennen (Robinson und Bellet, 1974)). Diese Befunde lassen sich durch folgenden Reifungsweg erklären (s. Abb. 36):

Der 82K-Protein-DNA-Komplex wird beginnend vom linken Ende in ein vorgefertigtes Prokapsid eingeschleust, wobei eventuell ein 39K-Protein aus dem Kapsid verdrängt wird. Die DNA ist dabei nicht mit irgendwelchen Proteinen bedeckt, was auch aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Verpackungsintermediaten hervorgeht (Moncany et al., in press). Im Kapsid erfolgt die Spaltung des 82K- zum 55K-Protein parallel zur Spaltung von pVI und pVIII. Während dieses Vorgangs treten die Core-Proteine V und pVII in das Kapsid ein, wobei eventuell das 50K-Protein verdrängt wird. Die Reifung wird durch vollständige Umwandlung der Vorläuferproteine abgeschlossen. Das "Proteinprocessing" erfolgt durch eine virus-

induzierte Protease, die in der Mutante H2ts1 defekt ist (Weber, 1976, Stillman et al., 1981). (Es ist räumlich schwer vorstellbar, wie in das Kapsid mit einem Durchmesser von 70 - 80 nm nach dem Eintritt einer 12 µm langen DNA noch die Core-Proteine eingeschleust werden können. In den weitgehend fertigen Viruspartikeln können jedoch auch noch enzymatische Reaktionen wie die proteolytische Spaltung der Vorläuferproteine stattfinden. Auch für diesen Vorgang dürften Proteinbewegungen im Virusinneren nötig sein.) Die Funktion der Core-Proteine scheint also nicht in der Komprimierung der DNA während der Verpackung zu liegen und bleibt somit unklar. Ebenso unklar ist, ob das "Processing" des terminalen Proteins für die korrekte Virionbildung nötig ist, oder eine Rolle für die Infektosität spielt.

Modifikationen bei der Kapsidbildung wurden in der letzten Zeit auch für die Proteine II (Devaux und Boulanger, 1980) und IIIa (Boudin et al., 1980) beschrieben. Auch für die Morphogenese anderer Viren spielen proteolytische Spaltungen eine wichtige Rolle. Ein Beispiel sind die Picornaviren (Jacobson et al., 1970) bei denen unter anderem auch das terminale Protein vor oder nach der Verpackung der RNA in ein vorgeformtes Prokapsid modifiziert wird (King et al., 1980, Richards et al., 1981).

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten Untersuchungen zur Funktion des Adenovirus DNA-Protein-Komplexes während des Infektionszyklus angestellt werden. Es wurde gezeigt, daß die gesamte intrazelluläre virale DNA und auch IN VITRO replizierende Ad2 DNA mit terminalem Protein assoziiert ist. Das wurde durch die verringerte Beweglichkeit der proteinhaltigen terminalen Restriktionsfragmente in detergentenhaltigen Agarose-Acrylamid-Mischgelen nachgewiesen. Mit diesem Nachweissystem konnte ferner gezeigt werden, daß zum Zeitpunkt maximaler DNA-Synthese (20 hpi) über 90 % der viralen DNA mit einem größeren Protein als dem 55K-Virion-Protein verbunden ist. Für das Molekulargewicht dieses Vorläuferproteins wurde nach ^{125}J -Markierung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein Wert von 82000 Dalton bestimmt. Durch Puls- und Puls-Chase-Experimente konnte gezeigt werden, daß die Umwandlung vom 82K- zum 55K-Protein erst 2 - 5 Stunden nach Beginn der DNA-Replikation erfolgt. Diese Umwandlung geschieht parallel zum "Processing" der Vorläuferstrukturproteine pVI und pVIII erst nach der Verpackung der DNA in Virusprokapside. Im Verlauf der Untersuchung von DNA-Protein-Komplexen aus Virusreifungsintermediaten wurde eine bisher nicht beschriebene Zwischenstufe der Virusmorphogenese isoliert, charakterisiert und in die bestehenden Vorstellungen über die Virusreifung eingeordnet. Das auffälligste Charakteristikum dieses Intermediats war das Fehlen der Core-Proteine oder deren Vorläufer bei gleichzeitiger Anwesenheit von genomlanger DNA. Damit wurde klar,

daß die Core-Proteine erst nach dem DNA-Eintritt auf einer späteren Entwicklungsstufe in das Kapsid eingeschleust werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob das terminale Protein virus- oder zellkodiert ist. Dazu wurden die Proteine an viraler DNA aus HeLa-, BHK-, Mm- und TC7-Zellen verglichen. Ad2 Virionen aus diesen Zellen enthielten alle ein DNA-gebundenes 55K-Protein, virale intrazelluläre DNA daneben auch ein 82K-Protein. Durch Vergleich der Peptidmuster nach V8-Protease-Verdauung konnte gezeigt werden, daß alle diese Proteine einander zumindest sehr ähnlich sind. Das ließe sich durch ein viruskodiertes Protein erklären.

7. Literaturverzeichnis

- Abboud, M.A. and Horwitz, M.S., 1979. The DNA-polymerases associated with the adenovirus type 2 replication complex: effect of 2'-3'-dideoxythymidine-5'-triphosphate on viral DNA synthesis. Nucl. Acid Res. 6, 1025 - 1039
- Akusjärvi, G. and Persson, H., 1981. Gene and mRNA for precursor polypeptide VI from adenovirus type 2. J. Virol. 38, 469 - 482
- Ambros, V. and Baltimore, D., 1978. Protein is linked to the 5'-end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to Tyrosine. J. Biol. Chem. 253, 5263 - 5266
- Arens, M., Yamashita, T., Padmanabhan, R., Tsuruo, T. and Green, M., 1977. Adenovirus DNA replication. Characterization of the enzyme activities of a soluble replication system. J. Biol. Chem. 252, 7947 - 7954
- Arens, M. and Yamashita, T., 1978. IN VITRO termination of adenovirus DNA synthesis by a soluble replication complex. J. Virol. 25, 698 - 702
- Ariga, H. and Shimojo, H., 1978. Initiation and termination of adenovirus 12 DNA replication. II. Analysis of pulse-labeled oligonucleotides derived from 5'termini in the DNA strand. Virology 78, 98 - 108
- Ariga, H., Klein, H., Levine, A.J. and Horwitz, M.S., 1980. A cleavage product of the adenovirus DNA binding protein is active in DNA replication IN VITRO. Virology 101, 307 - 310
- Arrand, J. and Roberts, R.J., 1979. The nucleotide sequences of the termini of adenovirus 2 DNA. J. Mol. Biol. 128, 577 - 594

- Bachenheimer, S. and Darnell, J.E., 1975. Hybridization of mRNA from adenovirus transformed cells to segments of the adenovirus genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4445 - 4449
- Begin, M. and Weber, J., 1975. Genetic analysis of adenovirus type 2. I. Isolation and genetic characterisation of temperaturesensitive mutants. J. Virol. 15, 1 - 7
- Bellet, A.J.D. and Younghusband, H.B., 1972. Replication of the DNA of chick embryo lethal orphan virus. J. Mol. Biol. 72, 691 - 709
- Beltz, G.A. and Flint, S.J., 1979, Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection. Restriction of cellular messenger RNA to the nucleus. J. Mol. Biol. 131, 353 - 373
- Berk, A.J. and Sharp, P.A., 1977. UV mapping of the adenovirus 2 early promoters. Cell 12, 45 - 55
- Bhatti, A.R. and Weber, J., 1979. Protease of adenovirus type 2: Partial characterization. Virology 96, 478 - 485
- Blair, D.G., Clewell, D.B., Sheratt, D.J. and Helinski, D.R., 1971. Strand-specific supercoiled DNA protein relaxation complexes: comparison of the complexes of bacterial plasmids ColE1 and ColE2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 210 - 214
- Bodnar, J.W. and Pearson, G.D., 1980. Kinetics of adenovirus DNA-replication. I. Rate of adenovirus DNA-replication. Virology 100, 208 - 211
- Bolton, A.E. and Hunter, W.M., 1973. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵J-containing acylating agent. Biochem. J. 132, 529 - 539

- Bonner, W.M. and Laskey, R.A., 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83 - 88
- Boudin, M.-L., D'Halluin, J.-C., Cousin, C. and Boulanger, P., 1980. Human adenovirus type 2 protein IIIa. II. Maturation and encapsidation. *Virology* 101, 144 - 156
- Boulanger, P.A., 1975. Adenovirus assembly: Self-assembly of partially digested hexons. *J. Virol.* 16, 1678 - 1682
- Bourgaux, P., Delbecchi, L. and Bourgaux-Ramoisy, D., 1976. Initiation of adenovirus type 2 DNA replication. *J. Virol.* 72, 89 - 98
- Brisson, O., Kedinger, C. and Wilhelm, J., 1977. Enzymatic properties of viral replication complexes isolated from adenovirus type 2-infected HeLa cell nuclei. *J. Virol.* 24, 423 - 435
- Brown, D.T., Westphal, M., Burlingham, B.T., Winterhoff, U. and Doerfler, W., 1975. Structure and composition of the adenovirus type 2 core. *J. Virol.* 16, 366 - 387
- Burlingham, B.T., Brown, D.T. and Doerfler, W., 1974. Incomplete particles of adenovirus. I. Characterization of the DNA associated with incomplete adenovirions of type 2 and 12. *Virology* 60, 419 - 430
- Carusi, E.A., 1977. Evidence of blocked 5'-termini in human adenovirus DNA. *Virology* 76, 380 - 394
- Cavalier-Smith, T., 1974. Palindromic base sequences and replication of eucaryotic chromosome ends. *Nature* 250, 467 - 470

- Challberg, M.D. and Kelly, T.J.jr., 1979a. Adenovirus DNA replication IN VITRO. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 655 - 659
- Challberg, M.D. and Kelly, T.J.jr., 1979b. Adenovirus DNA replication IN VITRO. Origin and direction of daughter strand synthesis. J. Mol. Biol. 135, 999 - 1011
- Challberg, M.D., Desiderio, S.V. and Kelly, T.J.jr., 1980. Adenovirus DNA replication IN VITRO. Characterization of a protein covalently linked to nascent DNA strands. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5105 - 5109
- Challberg, M.D. and Kelly, T.J.jr., 1981. Processing of the adenovirus terminal protein. J. Virol. 38, 272 - 277
- Chardonnet, Y. and Dales, S., 1970. Early events in the interaction between adenoviruses and HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome. Virology 40, 462 - 477
- Chardonnet, Y. and Dales, S., 1970. Early events in the interaction between adenoviruses and HeLa cells. II. Comparative observations on the penetration of types 1, 5, 7 and 12.
- Chinnadurai, G., Chinnadurai, S. and Green, M., 1978. Enhanced infectivity of adenovirus type 2 DNA and a DNA-protein complex. J. Virol. 26, 195 - 199
- Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R. and Roberts, R.J., 1977. An amazing sequence arrangement at the 5'ends of adenovirus 2 messenger RNA. Cell 12, 1 - 8
- Chow, L.T. and Broker, T.R., 1978. The spliced structure of adenovirus 2 fibre message and other late mRNAs. Cell 15, 497 - 510

- Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. and Laemmli, U.K., 1977. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252, 1102 - 1106
- Cleveland, D.W., Kirschner, M.W. and Cowan, N.J., 1978. Isolation of separate mRNAs for α - and β -Tubulin and characterization of the corresponding IN VI-TRO translation products. *Cell* 15, 1021 - 1031
- Coombs, D.H., Robinson, A.J., Bodnar, J.W., Jones, C.J. and Pearson, G.D., 1979. Detection of covalent DNA-protein complexes: The adenovirus DNA-terminal protein complex and HeLa DNA-protein complexes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43, 741 - 753
- Corden, J., Engelking, H.M. and Pearson, G.D., 1976. The chromatin-like organization of the adenovirus chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 401 - 404
- Cornick, G., Sigler, P.B. and Ginsberg, H.S., 1973. Mass of protein in the asymmetric unit of hexon crystals - a new method. *J. Mol. Biol.* 73, 533 - 537
- Dales, S. and Chardonnet, Y., 1973. Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. *Virology* 56, 465 - 483
- Daniell, E., 1976. Genome structure of incomplete particles of adenovirus. *J. Virol.* 19, 685 - 708
- Daubert, S.D. and Bruening, G., 1979. Genome-associated proteins of comoviruses. *Virology* 98, 246 - 250

- Desiderio, S.V. and Kelly, T.J.jr., 1981. Structure of the linkage between adenovirus DNA and 55000 molecular weight terminal protein. *J. Mol. Biol.* 145, 319 - 337
- Devaux, C. and Boulanger, P., 1980. Reactive serine in human adenovirus hexon polypeptides. *Virology* 102, 94 - 106
- D'Halluin, J.-C., Martin, G., Torpier, G. and Boulanger, P., 1978a. Adenovirus type 2 assembly analyzed by reversible cross-linking of labile intermediates. *J. Virol.* 26, 357 - 363
- D'Halluin, J.-C., Milleville, M., Boulanger, P. and Martin, G.R., 1978b. Temperature-sensitive mutants of adenovirus type 2 blocked in virion assembly: Accumulation of light intermediate particles. *J. Virol.* 26, 344 - 356
- D'Halluin, J.-C., Milleville, M., Martin, G.R. and Boulanger, P., 1980. Morphogenesis of human adenovirus type 2 studied with fibre- and fibre and penton base-defective temperature sensitive mutants. *J. Virol.* 33, 88 - 99
- Doerfler, W., 1969. Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK 21) with adenovirus type 12. *Virology* 38, 587 - 606
- Dulbecco, R. and Vogt, M., 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 99, 396 - 397
- Dulbecco, R. and Freeman, G., 1959. Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8, 396 - 397
- Eagle, H., 1959. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130, 432 - 437
- Edvardsson, B., Everitt, E., Jornvall, H., Prage, L. and Philipson, L., 1976. Intermediates in adenovirus assembly. *J. Virol.* 12, 533 - 547

- Edvardsson, B., Ustacelebi, S., Williams, J. and Philipson, L., 1978. Assembly intermediates among adenovirus type 5 temperature sensitive mutants. *J. Virol.* 25, 641 - 651
- Eisenberg, S., Griffith, J. and Kornberg, A., 1977. Φ X 174 cistron A protein is a multifunctional enzyme in DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3198 - 3202
- Eisenberg, S., 1980. Cleavage of Φ X single-stranded DNA by gene A protein and formation of a tight protein-DNA complex. *J. Virol.* 35, 409 - 413
- Ellens, D.J., Sussenbach, J.S. and Jansz, H.S., 1974. Studies on the mechanism of replication of adenovirus DNA. III. Electron microscopy of replicative DNA. *Virology* 61, 427 - 444
- Enomoto, T., Lichy, J.H., Ikeda, J. and Hurwitz, J., 1981. Adenovirus DNA replication IN VITRO: Purification of the terminal protein in a functional form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6779 - 6783
- Ensinger, M.J. and Ginsberg, H.S., 1972. Selection and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of type 5 adenovirus. *J. Virol.* 10, 328 - 339
- Escarmis, L. and Salas, M., 1981. Nucleotide sequence at the termini of the DNA of Bacillus subtilis phage ϕ 29. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1446 - 1450
- Estes, M.K., 1978. Characterization of DNA-protein complexes from simian adenovirus SA7. *J. Virol.* 25, 917 - 922
- Everitt, E., Sundquist, B., Pettersson, U. and Philipson, L., 1973. Structural proteins of adenoviruses. X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2. *Virology* 62, 130 - 147

- Flanegan, J.B., Pettersson, R.F., Ambros, V., Hewlett, H.J. and Baltimore, D., 1977. Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5' terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 961 - 965
- Flint, S.J. and Sharp, P.A., 1976. Adenovirus transcription. V. Quantitation of viral RNA sequences in adenovirus 2-infected and transformed cells. *J. Mol. Biol.* 106, 749 - 771
- Flint, S.J., Berget, S.M. and Sharp, P.A., 1976. Characterization of single-stranded viral DNA sequences present during replication of adenovirus type 2 and 5. *Cell* 2, 559 - 571
- Franklin, R.M., Pettersson, U., Akervall, K., Strandberg, B. and Philipson, L., 1971. Structural proteins of adenoviruses. V. On the size and structure of the adenovirus type 2 hexon. *J. Mol. Biol.* 57, 383 - 395
- Frenkel, G.D., 1978. Adenovirus DNA synthesis IN VITRO in an isolated complex. *J. Virol.* 25, 459 - 463
- Nitterer, J., 1978. DNA-Proteinkomplexe in Adenovirus-infizierten HeLa-Zellen. Diplomarbeit, Biochemisches Institut der Universität München
- Galos, R.S., Williams, J., Binger, M.-H. and Flint, S.J., 1979. Location of additional early gene sequences in the adenoviral chromosome. *Cell* 17, 945 - 956
- Garon, C.F., Berry, R.W. and Rose, J.A., 1972. A unique form of terminal redundancy in adenovirus DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2391 - 2395

- Ginsberg, H.S. and Dixon, M.K., 1961. Nucleic acid synthesis in types 4 and 5 adenovirus-infected HeLa cells. *J. Exp. Med.* 113, 283
- Ginsberg, H.S., Bello, L.J. and Levine, A.J., 1967. Control of biosynthesis of host macromolecules in cells infected with adenovirus. In "The molecular biology of viruses", J.S. Colter and W. Paranchych (Eds.), Academic Press, 547 - 572
- Ginsberg, H.S., Ensinger, M.J., Kauffmann, R.S., Mayer, A.J. and Lundholm, U., 1974. Cell transformation: A study of regulation with types 5 and 12 adenovirus temperature-sensitive mutants. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39, 419 - 426
- Girard, M., Bouche, J.-P., Marty, L., Revet, B. and Berthelot, N., 1977. Circular adenovirus DNA-protein complexes from infected HeLa cell nuclei. *Virology* 83, 34 - 55
- Green, M., 1962. Studies on the synthesis of viral DNA. IV. Isolation, purification and chemical analysis of adenovirus. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27, 219
- Green, M. and Piña, M., 1964. Biochemical studies on adenovirus multiplication. VI. Properties of highly purified tumorigenic human adenoviruses and their DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 1251 - 1259
- Green, M., Piña, M. and Chagoya, V., 1964. Biochemical studies on adenovirus multiplication. V. Enzymes of DNA synthesis in cells infected by adenovirus and vaccinia virus. *J. Biol. Chem.* 239, 1188 - 1197

- Green, M., Piña, M., Kimes, R., Wensink, P.C., Machattie, L.A. and Thomas, C.A., 1967a. Adenovirus DNA. I. Molecular weight and conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 1302 - 1309
- Green, M., Piña, M. and Kimes, R.C., 1967b. Biochemical studies on adenovirus multiplication. XII. Plaquing efficiencies of purified human adenoviruses. *Virology* 31, 562 - 565
- Green, M., Mackey, J.K., Wold, W.S.M. and Rigden, P., 1979a. Thirty-one human adenovirus serotypes (Ad1 - 31) form five groups (A - E) based upon genome homologies. *Virology* 93, 481 - 492
- Green, M., Brackmann, K., Wold, W.S.M., Cartas, M., Thornton, H. and Elder, J.H., 1976b. Conserved primary sequences of the DNA terminal proteins of five different human adenovirus groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4380 - 4384
- Green, M., Wold, W.S.M., Brackmann, K.H. and Cartas, M.A., 1979c. The 55K protein on the 5' termini of adenovirus type 2 DNA is unrelated to virus-coded candidate transformation proteins (E1 - 53K, E1 - 40K - 50K) and DNA-binding proteins (E2 - 42K / 47K / 73K). *J. Virol.* 31, 836 - 840
- Green, M., Symington, J., Brackmann, K.H., Cartas, M.A., Thornton, H. and Young, L., 1981. Immunological and chemical identification of intracellular forms of adenovirus type 2 terminal protein. *J. Virol.* 40, 541 - 550
- Greene, P.J., Heyneker, F., Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Detlach, M.C., Covarrubias, A.A., Backman, K., Russel, D.J., Tait, R. and Boyer, H.W., 1978. A general method for the purification of restriction enzymes. *Nucl. Acids Res.* 5, 2373 - 2380

- Guiney, D.G. and Helinski, D.R., 1975. Relaxation complexes of plasmid DNA and protein. III. Association of protein with the 5' terminus of the broken DNA strand in the relaxed complex of plasmid ColE1. *J. Biol. Chem.* 250, 8796 - 8803
- Hammarskjöld, M.-L. and Winberg, G., 1980. Encapsulation of adenovirus 16 DNA is directed by a small DNA sequence at the left end of the genome. *Cell* 20, 787 - 795
- Harding, N.E. and Ito, J., 1976. DNA replication of bacteriophage ϕ 29: Isolation of a DNA-protein complex from *Bacillus subtilis* cells infected with wild type and with a suppressor-sensitive mutant. *Virology* 73, 389 - 401
- Harding, N.E., Ito, J. and David, G.S., 1978. Identification of the protein firmly bound to the ends of bacteriophage ϕ 29 DNA. *Virology* 84, 279 - 292
- Harding, N.E. and Ito, J., 1980. DNA replication of bacteriophage ϕ 29: Characterization of the intermediates and location of the termini of replication. *Virology* 104, 323 - 338
- Hari, V., 1981. The RNA of tobacco etch virus: Further characterization and detection of protein linked to RNA. *Virology* 112, 391 - 399
- Harrison, B.D. and Barker, H., 1978. Protease sensitive structure needed for infectivity of nepoviral RNA. *J. Gen. Virol.* 40, 711 - 715
- Harter, M.L., Lewis, J.D. and Anderson, C.W., 1979. Adenovirus type 2 terminal protein: Purification and comparison of tryptic peptides with known adenovirus coded proteins. *J. Virol.* 31, 823 - 835

- Nashimoto, S. and Green, M., 1979. Methylated 5'-terminal caps of adenovirus type 2 early mRNA: Evidence for at least six 5'-termini. *Virology* 94, 254 - 272
- Payward, G.S. and Smith, M.G., 1972. The chromosome of bacteriophage T5. I. Analysis of the single-stranded DNA fragments by agarose gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 63, 383 - 395
- Neilmann, C.A. and Rouse, H., 1980. Adenovirus type 2 polypeptide synthesis in arginine-deprived cells. *Virology* 105, 159 - 170
- Hilleman, M.R. and Werner, J.H., 1954. Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 85, 183 - 188
- Horwitz, M.S., Scharff, M.D. and Maizel, J.V., 1969. Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly of capsomeres and morphogenesis of the virion. *Virology* 39, 632 - 694
- Horwitz, M.S., Maizel, J.V. and Scharff, M.D., 1970. Molecular weight of adenovirus type 2 hexon polypeptide. *J. Virol.* 6, 569 - 571
- Horwitz, M.S., 1971. Intermediates in the synthesis of type 2 adenovirus DNA. *J. Virol.* 8, 675 - 683
- Horwitz, M.S., 1976. Bidirectional replication of adenovirus type 2 DNA. *J. Virol.* 18, 307 - 315
- Horwitz, M.S., Kaplan, L.M., Abboud, M.A., Maritato, J., Chow, L.T. and Broker, T.R., 1979. Adenovirus DNA replication in soluble extracts of infected cell nuclei. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43, 769 - 780

- Houmard, J. and Drapeau, G.R., 1972. Staphylococcal protease: A proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3506 - 3509
- Huebner, R.J., 1967. Adenovirus-directed tumor and T-antigens. In "Perspectives in Virology", M. Pollard (ed.) 5, 147 - 166, Academic Press, New York
- Inciarte, M.R., Salas, M. and Sogo, J.M., 1980. Structure of replicating DNA molecules of Bacillus subtilis bacteriophage ϕ 29. J. Virol. 34, 187 - 199
- Ishibashi, M. and Maizel, J.V.jr., 1974. The polypeptides of adenovirus. V. Young virions, structural intermediates between top components and aged virions. Virology 57, 409 - 421
- Jacobson, M.F., Asso, J. and Baltimore, D., 1970. Morphogenesis of poliovirus. I. Association of viral RNA with coat protein. J. Mol. Biol. 33, 369 - 378
- Jornvall, J., Pettersson, U. and Philipson, L., 1974. Structural studies on adenovirus type 2 hexon protein. Eur. J. Biochem. 48, 179 - 192
- Kaplan, L.M., Kleinmann, R.E. and Horwitz, M.S., 1977. Replication of adenovirus type 2 DNA IN VITRO. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4425 - 4429
- Kaplan, L.M., Ariga, H., Hurwitz, J. and Horwitz, M.S., 1979. Complementation of the temperature-sensitive defect in H5 ts125 adenovirus DNA replication IN VITRO. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5534 - 5538

- Kasamatsu, H. and Wu, M., 1976. Structure of a nicked DNA-protein complex isolated from simian virus 40; covalent attachment of the protein to DNA and nick specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1945 - 1949
- Kathmann, H.-P., 1974. Isolation von temperatur-sensitiven Mutanten von Adenovirus Typ 2. Diplomarbeit, Institut für Genetik der Universität zu Köln
- Kathmann, H.-P., Schick, J., Winnacker, E.-L. and Doerfler, W., 1976. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of adenovirus type 2. J. Virol. 19, 43 - 53
- Kedinger, C., Brison, O., Perrin, F. and Wilhelm, J., 1978. Structural analysis of viral replicative intermediates isolated from adenovirus type 2-infected HeLa cell nuclei. J. Virol. 26, 364 - 379
- Kelly, T.J. and Thomas, C.A., 1969. An intermediate in the replication of bacteriophage T7 DNA molecules. J. Mol. Biol. 44, 459 - 475
- Kelly, T.J.jr. and Lechner, R.L., 1979. The structure of replicating adenovirus DNA molecules: Characterization of DNA-protein complexes from infected cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 721 - 728
- Kessler, S.W., 1975. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. J. Immunol. 115, 1617 - 1624
- King, A.M.Q., Sangar, D.V., Harris, T.J.R. and Brown, F., 1980. Heterogeneity of the genome linked protein of foot-and-mouth disease virus. J. Virol. 34, 627- 634

- Klessig, D.F., 1977. Two adenovirus mRNAs have a common 5'terminal leader sequence encoded at least 10 kb upstream from their main coding regions. *Cell* 12, 9 - 21
- Lämmlli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 - 685
- Langeveld, S.A., van Mansfeld, A.D.M., Baas, P.D., Jansz, H.S., van Arkel, G.A. and Weisbeek, P.J., 1978. Nucleotide sequence of the origin of replication in bacteriophage Φ X 174 RF DNA. *Nature* 271, 417 - 420
- Larsen, S.H. and Nathans, D., 1977. Mouse adenovirus: Growth of plaque-purified FL virus in cell lines and characterization of viral DNA. *Virology* 82, 182 - 195
- Laskey, R.A. and Mills, A.D., 1975. Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.* 56, 335 - 341
- Laskey, R.A. and Mills, A.D., 1977. Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}I using intensifying screens and hypersensitized film. *FEBS Letters* 82, 314 - 316.
- Lechner, R.L. and Kelly, T.J.jr., 1977. The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules. *Cell* 12, 1007 - 1020.
- Ledinko, N., 1968. Enhanced DNA polymerase activity in human embryonic kidney cultures infected with adenovirus 2 or 12. *J. Virol.* 2, 89 - 98
- Ledinko, N., 1970. Transient stimulation of DNA-dependant RNA polymerase and histone acetylation in human embryonic kidney cultures infected with adenovirus 2 or 12: Apparent induction of host DNA synthesis. *J. Virol.* 6, 58 - 68

- Lee, Y.L., Nomoto, A., Detjen, B.M. and Wimmer, E.,
1977. A protein covalently linked to poliovirus
genome RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 59-63
- Leibowitz, J. and Horwitz, M.S., 1975. Synthesis and
assembly of adenovirus polypeptides. III. Re-
versible inhibition of hexon assembly in adeno-
virus type 5 temperature-sensitive mutants.
Virology 66, 10 - 24
- Lenk, R., Storch, T. and Maizel, J.V.jr., 1980.
Cell architecture during adenovirus infection.
Virology 105, 19 - 34
- Levine, A.J. und Ginsberg, H.S., 1967. Mechanism by
which fibre antigen inhibits multiplication of
type 5 adenovirus. J. Virol. 1, 747 - 757
- Levine, A.J., Kang, H.S. and Billheimer, F.E., 1970.
DNA replication in SV40 infected cells. I. Ana-
lysis of replicating SV40 DNA.
J. Mol. Biol. 50, 549 - 568
- Levine, A.J., van der Vliet, P.C., Rosenwirth, B.,
Rabek, J., Frenkel, G. and Ensinger, M., 1974.
Adenovirus-infected, cell-specific, DNA-binding
proteins. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.
39, 559 - 566
- Lewis, A.M.jr., Levin, M.J., Wieser, W.H., Crumpacker,
C.S. and Henry, P.N., 1969. A nondefective (com-
petent) adenovirus-SV40 hybrid isolated from
the Ad2-SV40 hybrid population. Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 63, 1128 - 1135
- Lewis, J.B., Atkins, J.F., Daum, P.R., Solem, R., Ge-
steland, R.F. and Anderson, C.W., 1976. Location
and identification of the genes of adenovirus
type 2 early polypeptides. Cell 7, 141 - 151

- Lichy, J.E., Horwitz, M.S. and Horwitz, J., 1981.
Formation of a covalent complex between the
80000 dalton adenovirus terminal protein and
5'dCMP IN VITRO. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78,
2678 - 2682
- Lindberg, U., Persson, T. and Philipson, L., 1972.
Isolation and characterization of adenovirus
mRNA in productive infection.
J. Virol. 10, 909 - 919
- Lischue, M.A. and Sung, M.T., 1977. A histone-like
protein from adenovirus chromatin.
Nature 267, 552 - 555
- Lonberg-Holm, K. and Philipson, L., 1969. Early events
of virus-cell interactions in an adenovirus sys-
tem. J. Virol. 4, 323 - 338
- Longiaru, M., Ikeda, J., Jarkowsky, Z., Horwitz, S.B.
and Horwitz, M.S., 1979. The effect of aphidi-
colin on adenovirus DNA synthesis.
Nucl. Acid. Res. 6, 3369 - 3386
- Lovett, M.A. and Helinski, D.R., 1975. Relaxation com-
plexes of plasmid DNA and protein. II. Charac-
terization of the proteins associated with the
unrelaxed and relaxed complexes of plasmid ColE1.
J. Biol. Chem. 250, 8790 - 8795
- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Fau, A.L. and Randall,
R.J., 1951. Protein measurement with the Folin
phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275
- Lucas, J.J. and Ginsberg, H.S., 1971. Synthesis of
virus-specific RNA in KB cells infected with
type 2 adenovirus. J. Virol. 8, 203
- Luftig, R.B. and Weihing, R.R., 1975. Adenovirus
binds to rat brain microtubules IN VITRO.
J. Virol. 16, 696 - 706

- Maizel, J.V.jr., White, D.O. and Scharff, M.D., 1968.
The polypeptides of adenovirus. II. Soluble
proteins, cores, top components, and the
structure of the virion.
Virology 36, 126 - 136
- Martin, G.R., Waroquier, R., Cousin, C., D'Halluin,
J.-C. and Boulanger, P.A., 1978. Isolation
and phenotypic characterization of human adeno-
virus type 2 temperature-sensitive mutants.
J. Gen. Virol. 41, 303 - 314
- Mellado, R.P., Penalva, M.A., Inciarte, M.R. and
Salas, M., 1980. The protein covalently linked
to the 5'termini of the DNA of Bacillus subtilis
phage ϕ 29 is involved in the initiation of DNA
replication. *Virology* 104, 84 - 96
- Miles, B.D., Luftig, R.B., Weatherbee, J.A., Weihing,
R.R. and Weber, J., 1980. Quantitation of the
interaction between adenovirus type 2 and 5
and microtubules inside infected cells.
Virology 105, 265 - 269
- Moncany, M.L.J., Revet, B. and Girard, M., 1982.
Characterization of a new adenovirus type 5
assembly intermediate. in press
- Morgan, C., Rosenkranz, H.S. and Medris, B., 1969.
Structure and development of viruses as ob-
served in the electron microscope. X. Entry
and uncoating of adenovirus.
J. Virol. 4, 777 - 796
- Mulder, C., Arrand, J.R., Delius, H., Keller, W.,
Petterson, U., Roberts, R.J. and Sharp, P.A.,
1974. Cleavage maps of adenovirus types 2 and 5
by restrictionendonucleases EcoRI and HpaI.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 397 -
400

- Murialdo, H. and Becker, A., 1978. Head morphogenesis of complex double-stranded DNA bacteriophages. *Microbiol. Rev.* 42, 529 - 576
- Nass, K. and Frenkel, G.D., 1980. Adenovirus-specific DNA-binding protein inhibits hydrolysis of DNA by DNase IN VITRO. *J. Virol.* 35, 314 - 319
- Nomoto, A., Lee, Y.F. and Wimmer, E., 1976. The 5'end of poliovirus mRNA is not capped with m⁷G(5')ppp(5')Np. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 375 - 380
- Nomoto, A., Detjen, B., Pozatti, R. and Wimmer, E., 1977a. The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* 268, 208 - 213
- Nomoto, A., Kitamura, N., Golini, F. and Wimmer, E., 1977b. The 5'-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5345 - 5349
- Norrby, E., 1968. Biological significance of structural adenovirus components. *Current Topics Microbiol. Immunol.* 43, 1 - 43
- Ortin, J., Scheidtmann, K.H., Greenberg, R., Westphal, M. and Doerfler, W., 1976. Transcription of the genome of adenovirus type 12. III. Maps of stable RNA from productively infected human cells and abortively infected and transformed hamster cells. *J. Virol.* 20, 355 - 372
- Padmanabhan, R. and Padmanabhan, R.V., 1977. Specific interaction of a protein(s) at or near the termini of adenovirus 2 DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 955 -964

- Peacock, A.C. and Dingman, C.W., 1968. Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by gelelectrophoresis in agarose acrylamide composite gels. *Biochemistry* 7, 668 - 674
- Periera, H.G. and Wrigley, N.G., 1974. IN VITRO reconstitution, hexon bonding and handedness of incomplete adenovirus capsids. *J. Mol. Biol.* 85, 617 - 631
- Persson, H., Perricaudet, M., Tolun, A., Philipson, L. and Pettersson, U., 1979a. Purification of RNA/DNA hybrids by exclusion chromatography. *J. Biol. Chem.* 254, 7999 - 8003
- Persson, H., Mathisen, B., Philipson, L. and Pettersson, U., 1979b. A maturation protein in adenovirus morphogenesis. *Virology* 93, 198 - 208
- Persson, H., Monstein, H.-J., Akusjärvi, G. and Philipson, L., 1981. Adenovirus early gene-products may control viral mRNA accumulation and translation IN VIVO. *Cell* 23, 485 - 496
- Persson, H. and Philipson, L., 1982. Regulation of adenovirus gene expression. *Current Topics Microbiol. Immunol.* in press
- Pettersson, U., 1973. Some unusual properties of replicating adenovirus type 2 DNA. *J. Mol. Biol.* 81, 521 - 527
- Philipson, L., Lonberg-Holm, K. and Pettersson, U., 1968. Virus-receptor interaction in an adenovirus system. *J. Virol.* 2, 1064 - 1075
- Philipson, L., Pettersson, U. and Lindberg, U., 1975. Molecular biology of adenoviruses. In "Virology monographs", Gard, S. and Hallauer, C. (eds.), 14, 1 - 115

- Piña, M. and Green, M., 1965. Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 547 - 551
- Piña, M. and Green, M., 1969. Biochemical studies on adenovirus multiplication. XIV. Macromolecule and enzyme synthesis in cells replicating oncogenic and non-oncogenic human adenoviruses. *Virology* 38, 573 - 586
- Pincus, S., Robertson, W. and Rekosh, D., 1981. Characterization of the effect of aphidicolin on adenovirus DNA replication: Evidence in support of a protein primer model of initiation. *Nucl. Acid. Res.* 19, 4919 - 4938
- Raskas, M.J., Thomas, D.C. and Green, M., 1970. Biochemical studies on adenovirus multiplication. XVIII. Ribosome synthesis in uninfected and infected KB cells. *Virology* 40, 893 - 902
- Reiter, T., 1980. Untersuchungen zur Replikation von Adenovirus typ 2 DNA. Dissertation, Institut für Biochemie der Universität München
- Reiter, T., Fütterer, J., Weingärtner, B. and Winnacker, E.-L., 1980. Initiation of adenovirus DNA replication. *J. Virol.* 35, 662 - 671
- Rekosh, D., Russell, W.C., Bellet, A.J.D. and Robinson, A. J., 1977. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* 11, 283 - 295
- Rekosh, D., 1981. Analysis of the DNA-terminal protein from different serotypes of human adenovirus. *J. Virol.* 40, 329 - 333

- Revet, B. and Benichou, D., 1981. Electron microscopy of Ad5 replicating molecules after IN VIVO photocrosslinking with trioxsalen. *Virology* 114, 60 - 70
- Revie, D., Tseng, B.Y., Grafstrom, R.W. and Goulian, M., 1979. Covalent association of protein with replicative form DNA of parvovirusHK-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5539 - 5543
- Richards, O.J., Mey, T.D. and Ehrenfeld, E., 1981. Two forms of VPg on poliovirus RNAs. *J. Virol.* 38, 863 - 871
- Roberts, R. J., Arrand, J.R. and Keller, W., 1974. The length of the terminal repetition in adenovirus 2 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3829 - 3833
- Robinson, A.J. and Bellet, A.J.D., 1974. A circular DNA-protein complex from adenovirus and its possible role in DNA replication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 523 - 530
- Robinson, A.J., Bodnar, J.W., Coombs, D.H. and Pearson, G.D., 1979. Replicating adenovirus 2 DNA molecules contain terminal protein. *Virology*, 96, 143 - 158
- Rose, J.A., Reich, P.R. and Weissman, S.M., 1965. RNA production in adenovirus infected KB cells. *Virology* 57, 571 - 579
- Rosenwirth, B., Tija, S., Westphal, M. and Doerfler, W., 1974. Incomplete particles of adenovirus. II. Kinetics of formation and polypeptide composition of adenovirus type 2. *Virology* 60, 431 - 437
- Rothberg, P.G., Harris, T.J.R., Nomoto, A. and Wimmer, E., 1978. O⁴-(5'-Uridyl)tyrosine is the bond between the genome-linked protein and the RNA of poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4868 - 4872

- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gillmore, L.K., Parrott, R.H. and Ward, T.G., 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 84, 570 - 573
- Russel, W.C. and Skehel, J.J., 1972. The polypeptides of adenovirus infected cells. *J. Gen. Virol.* 15, 45 - 57
- Salas, M., Mellado, R.P., Vinuela, E. and Soco, J.M., 1978. Characterization of a protein covalently linked to the 5' termini of the DNA of Bacillus subtilis phage ϕ 29. *J. Mol. Biol.* 119, 269 - 291
- Sambrook, J., Williams, J., Sharp, P.A. and Grodzicker, T., 1975. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *J. Mol. Biol.* 97, 369 - 390
- Sangar, D.V., Rowlands, D.J., Harris, T.J.R. and Brown, F., 1977. A protein covalently linked to foot-and mouth disease virus RNA. *Nature* 268, 648 - 650
- Schilling, R., Weingärtner, B. and Winnacker, E.-L., 1975. Adenovirus type 2 DNA replication. II. Termini of DNA replication. *J. Virol.* 16, 767 - 774
- Sharp, P.A., Sugden, B. and Sambrook, J., 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenza using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12, 3055 - 3063
- Sharp, P.A., Gallimore, P.H. and Flint, S.J., 1975. Mapping of adenovirus 2 RNA sequences in lytically infected cells and transformed cell lines. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39, 457 - 474
- Sharp, P.A., Moore, C. and Haverty, J.L., 1976. The infectivity of adenovirus 5 DNA-protein complex. *Virology* 75, 442 - 458

- Sharp, P.A., 1977. Adenovirus strand nomenclature: A proposal. *J. Virol.* 22, 830 - 831
- Shimojo, E. and Yamashita, T., 1968. Induction of DNA synthesis by adenoviruses in contact-inhibited hamster cells. *Virology* 36, 422 - 433
- Smiley, J.R. and Mak, S., 1976. Adenovirus type 12 specific RNA sequences during productive infection of KB cells. *J. Virol.* 19, 36 - 42
- Sogo, J.M., Garcia, J.A., Penalva, M.A. and Salas, M., 1982. Structure of protein-containing replicative intermediates of Bacillus subtilis phage ϕ 29 DNA. *Virology* 116, 1 - 18
- Spector, D.J., McGrogan, M. and Raskas, H.J., 1978. Regulation of cytoplasmic RNA from region 1 of the adenovirus genome. *J. Mol. Biol.* 126, 395 - 414
- Stanley, J., Rottier, P., Davies, J.W., Zabel, P. and van Kammen, A., 1978. A protein linked to the 5' termini of both components of cowpea mosaic virus genome. *Nucl. Acid. Res.* 5, 4505 - 4522
- Steenbergh, P.H., Maat, J., van Ormondt, H. and Susenbach, J.S., 1977. The nucleotide sequence at the terminus of adenovirus type 5 DNA. *Nucl. Acid. Res.* 4, 4371 - 4389
- Stillman, B.W. and Bellet, A.J.D., 1979. An adenovirus protein associated with the ends of replicating DNA molecules. *Virology* 93, 69 - 79
- Stillman, B.W., 1980. Adenovirus DNA replication IN VITRO: A protein linked to the 5' end of nascent DNA strands. *J. Virol.* 37, 139 - 147

- Stillman, B.W., Lewis, J.B., Chow, L.T., Mathews, M.B. and Smart, J.E., 1981. Identification of the gene and mRNA for the adenovirus terminal protein precursor. *Cell* 23, 497 - 508
- Studier, F.W., 1973. Analysis of early T7 RNAs and proteins. *J. Mol. Biol.* 79, 237 - 248
- Sundquist, B., Everitt, E., Philipson, L. and Höglund, S., 1973. Assembly of adenoviruses. *J. Virol.* 11, 449 - 459
- Sussenbach, J.S., 1967. Early events in the infection process of adenovirus type 5 in HeLa cells. *Virology* 33, 567 - 574
- Sussenbach, J.S., Ellens, D.J. and Jansz, H.S., 1973. Studies on the mechanism of replication of adenovirus DNA. II. The nature of single-stranded DNA in replicative intermediates. *J. Virol.* 12, 1131 - 1138
- Sussenbach, J.S. and Kuijk, M.G., 1977. Studies on the mechanism of replication of adenovirus DNA. V. The location of termini of replication. *Virology* 77, 149 - 157
- Sussenbach, J.S. and Kuijk, M.G., 1978a. The mechanism of replication of adenovirus DNA. VI. Localization of the origins of the displacement synthesis. *Virology* 84, 509 - 517
- Sussenbach, J.S. and Kuijk, M.G., 1978b. Initiation of adenovirus DNA replication does not occur via a hairpin mechanism. *Nucl. Acid. Res.* 5, 1289 - 1295
- Svensson, U., Persson, R. and Everitt, E., 1981. Virus-receptor interaction in the adenovirus-system. I. Identification of virion attachment proteins of the HeLa cell plasma membrane. *J. Virol.* 38, 70 - 81

- Tal, J., Craig, E.A. and Raskas, H.J., 1975.
Sequence relationships between adenovirus 2
early RNA and viral RNA size classes synthe-
sized at 18 hours after infection.
J. Virol. 15, 137 - 144
- Tattersall, P. and Ward, D.C., 1976. The rolling
hairpin: A model for the replication of par-
vovirus and linear chromosomal DNA.
Nature 263, 106 - 109
- Thomas, D.C. and Green, M., 1966. Biochemical studies
on adenovirus multiplication. XI. Evidence
for a cytoplasmic site for the synthesis of
viral coded proteins. Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 56, 243 - 246
- Tibbetts, C., Pettersson, U., Johansson, K. and Phi-
lipson, L., 1974. Transcription of the adeno-
virus type 2 genome. I. Relationship of cyto-
plasmic RNA to the complementary strands of
viral DNA. J. Virol. 13, 370 - 377
- Tolun, A. and Pettersson, U., 1975. Termination sites
for adenovirus type 2 DNA replication.
J. Virol. 16, 759 - 766
- Tomizawa, J. and Ogawa, T., 1968. Replication of
phage lambda DNA. Cold Spring Harbor Symp.
Quant. Biol. 33, 533 - 551
- Tomizawa, J., Ohmori, H. and Bird, R.E., 1977.
Origin of replication of colicin E1 plasmid
DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 154 - 157
- Tuszynski, G.P., Knight, L., Piperno, J.R. and
Walsh, P.N., 1980. A rapid method for remo-
val of (¹²⁵J)-jodide following iodination of
protein solutions. Anal. Biochem. 106, 118-122

- Ullrich, K., 1979. Rekombinationsprozesse zwischen Virus-DNS und Restriktionsfragmenten in adeno-virus-infizierten HeLa Zellen. Diplomarbeit, Institut für Biochemie der Universität München
- Valentine, R.C. and Periera, H.G., 1965. Antigens and the structure of the adenovirus. J. Mol. Biol. 13, 13 - 20
- van der Eb, A.J., 1973. Intermediates in type 5 adenovirus DNA replication. Virology 51, 11-23
- van der Vliet, P.C. and Levine, A.J., 1973. DNA binding proteins specific for cells infected by adenovirus. Nature 246, 170 - 176
- van der Vliet, P.C., Levine, A.J., Ensinger, M.J. and Ginsberg, H.S., 1975. Thermolabile DNA binding proteins from cells infected with a temperature-sensitive mutant of adenovirus defective in viral DNA synthesis. J. Virol. 15, 348 - 354
- van der Vliet, P.C. and Sussenbach, J.S., 1975. An adenovirus type 5 gene function required for initiation of viral DNA replication. Virology 67, 415 - 426
- van der Vliet, P.C., Zandberg, J. and Jansz, H.S., 1977. Evidence for a function of the adenovirus DNA-binding protein in initiation as well as in elongation of nascent DNA chains. Virology 80, 98 - 110
- van der Werf, S., Bouche, J.-P., Mechali, M. and Girard, M., 1980. Involvement of DNA polymerases α and γ in replication of adenovirus DNA IN VITRO. Virology 104, 56 - 72
- van Wielink, P.S., Naaktgeboren, N. and Sussenbach, J.S., 1979. Presence of protein at the termini of intracellular adenovirus type 5 DNA. Biochim. Biophys. Acta 563, 89 - 99

- Vardimon, L. and Doerfler, W., 1980. Persistent infection of Muntiacus muntjak cells with adenovirus type 2 and abortive infection with adenovirus type 12. *Virology* 101, 72-80
- Veerisetty, V. and Seghal, O.P., 1980. ProteinaseK sensitive factor essential for the infectivity of southern bean mosaic virus ribonucleic acid. *Phytopathology* 70, 282 - 284
- Velicer, L.F. and Ginsberg, H.S., 1970. Synthesis, transport and morphogenesis of type 5 adenovirus capsid proteins. *J. Virol.* 5, 338 - 352
- Wadell, G., 1970. Structural and biological properties of capsid components of human adenoviruses. Ph.D. Thesis, Karolinski Inst., Stockholm
- Weber, J., 1976. Genetic analysis of adenovirus type 2. III. Temperature sensitivity of processing of viral proteins. *J. Virol.* 17, 462 - 471
- Weingärtner, B., Winnacker, E.-L., Tolun, A. and Pettersson, U., 1976. Two complementary strand-specific termination sites for adenovirus DNA replication. *Cell* 2, 259 - 268
- Weissbach, A., 1975. Vertebrate DNA polymerases. *Cell*, 5, 101 - 108
- Weissbach, A., 1977. Eucaryotic DNA polymerases. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 25 - 47
- Wilcox, W.C. and Ginsberg, H.S., 1963. Protein synthesis in type 5 adenovirus infected cells. Effect of p-fluorophenylalanine on synthesis of protein, nucleic acids, and infectious virus. *Virology* 20, 269

- Wilcox, W.C., Ginsberg, H.S. and Anderson, T.F., 1963.
Structure of the type 5 adenovirus. III. Fine
structure of virus subunits, morphogenic rela-
tionship of structural subunits to virus speci-
fic soluble antigens from infected cells.
J. Exp. Med. 118, 307 - 314
- Wilhelm, J., Brison, O., Keding, C. and Chambon, P.,
1976. Characterization of adenovirus type 2
transcriptional complexes isolated from infected
HeLa cell nuclei. J. Virol. 19, 61 - 81
- Wilkie, N.M., Ustacelebi, S. and Williams, J.F., 1973.
Characterization of temperature-sensitive mu-
tants of adenovirus type 5: Nucleic acid syn-
thesis. Virology, 51, 499 - 503
- Williams, J.F., 1973. Oncogenic transformation of
hamster embryo cells IN VITRO by adenovirus
type 5. Nature 243, 162 - 163
- Williams, J.F., Young, C.S.H. and Austin, P.E., 1974.
Genetic analysis of human adenovirus type 5 in
permissive and nonpermissive cells. Cold Spring
Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 427 - 437
- Winnacker, E.-L., Magnusson, G. and Reichard, P., 1972.
Replication of polyoma DNA in isolated nuclei.
I. Characterization of the system from mouse
fibroblast 3T6 cells. J. Mol. Biol. 72, 523 -
537
- Winnacker, E.-L., 1975. Adenovirus type 2 DNA repli-
cation. I. Evidence for discontinuous DNA syn-
thesis. J. Virol. 15, 744 - 758
- Winnacker, E.-L., 1978. Adenovirus DNA: Structure
and function of a novel replicon.
Cell 14, 761 - 773

- Winocour, E., 1963. Purification of polyoma virus.
Virology 19, 158 - 168
- Wold, W.S.M., Green, M. and Bittner, W., 1978.
Adenoviruses. In "The molecular biology of
animal viruses". Nayak, D.P. (ed.) pp. 673 -
768. Marcel Dekker, New York
- Wolfson, J. and Dressler, D., 1972. Adenovirus 2-DNA
contains an inverted terminal repetition.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3054 - 3057
- Wu, M., Roberts, R.J. and Davidson, N., 1977.
Structure of the inverted terminal repetition
of adenovirus type 2 DNA. J. Virol. 21, 766 -
777
- Yamashita, T., Arens, M. and Green, M., 1977. Adeno-
virus deoxyribonucleicacid replication: Isola-
tion of a soluble replication system and analy-
sis of the IN VITRO DNA product.
J. Biol. Chem. 252, 7940 - 7946
- Yamashita, T., Arens, M. and Green, M., 1978. Protein
synthesized early after infection is linked to
the termini of adenovirus type 2 DNA synthesized
IN VIVO and IN VITRO. J. Virol. 30, 497 - 507
- Yanowski, S., Kawamura, F. and Ito, J., 1976.
Thermolabile transfecting DNA from temperature-
sensitive mutant of phage ϕ 29.
Nature 259, 60 - 63
- Yoshikawa, H. and Ito, J., 1981. Terminal proteins
and short inverted terminal repeats of the
small Bacillus bacteriophage genomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2596 - 2600
- Ziff, E. and Evans, R., 1978. Coincidence of the
promoter and capped 5'-terminus of RNA from the
adenovirus 2 major late transcription unit.
Cell 15, 1463 - 1475

Lebenslauf

Name:	Johannes Fütterer
Geburtsdatum:	25. 07. 1953
Geburtsort:	Stuttgart
Eltern:	Hans-Günter Fütterer, Werbefachmann Irmgard Fütterer, geb. Chmielewski, Hausfrau
1960 - 1964	Volksschule Stuttgart-Giebel
1964 - 1965	Gymnasium Stuttgart-Feuerbach
1965 - 1967	Gymnasium Bad Homburg vdH.
1967 - 1972	Gymnasium Schongau
1972	Abitur
WS 1972/73	Beginn des Chemiestudiums an der Ludwig-Maximilians Universität München
1975	Diplomvorprüfung
1977	Diplomhauptprüfung
Sept. 1977 - Okt. 1978	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der Universität München
Okt. 1978 - Okt. 1981	Doktorarbeit am selben Institut

